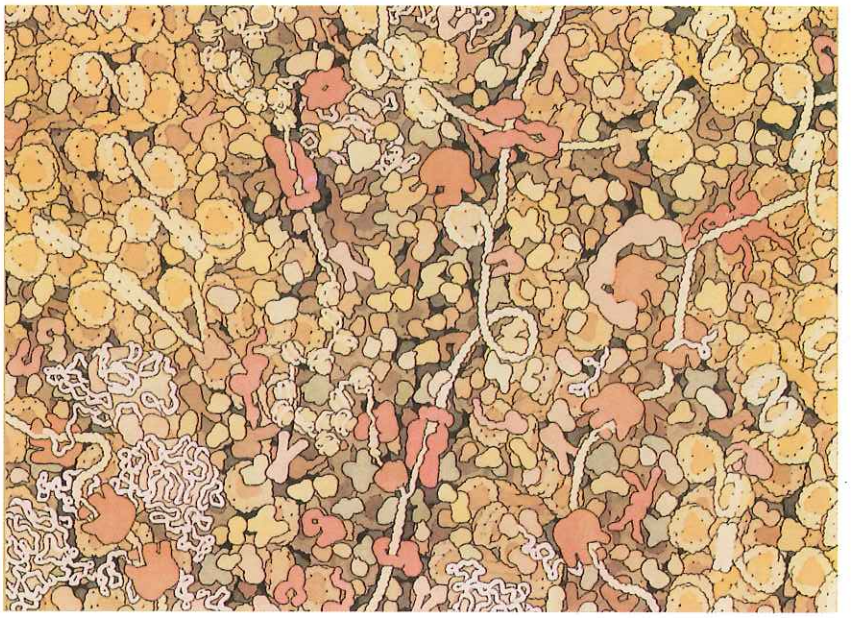
HÜCRE

MOLEKÜLER YAKLAŞIM

ÜÇÜNCÜ BASKI



GEOFFREY M. COOPER • ROBERT E. HAUSMAN

Boston Üniversitesi

Ertan ALTAYLI
Yrd.Doç.Tbp.Alb.(1995-35)
GATA Tıbbi Biyoloji A.D. Bşk.lığı
Diş/Dok.Tes.Nu.:75341/TBG.174

ÇEVİRİ EDİTÖRLERİ

MERAL SAKIZLI • NEŞE ATABEY

Dokuz Eylül Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İZMİR TIP KİTABEVİ

info@izmirtip.com.tr

www.izmirtip.com.tr

The Cell: A Moleculer Approach, Third Edition
Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman

Hücre: Moleküler Yaklaşım, Üçüncü Baskı
Prof. Dr. Meral SAKIZLI, Prof. Dr. Neşe ATABEY
İzmir Tıp Kitabevi, İZMİR, 2006.

Kitabın Türkçe'ye çeviri hakları ASM Press firması tarafından İzmir Tıp Kitabevi Tic. Ltd. Şirketi'ne devredilmiştir. Kitabın baskısının 5846 sayılı fikir ve sanat eserleri yasasının 6 ve 21. maddeleri uyarınca her hakkı saklı olup tamamen, kısmen kopya edilemez ve basılamaz. Her hakkı İzmir Tıp Kitabevi Tic. Ltd. Şirketi'ne aittir.

ISBN 9944 - 5148 - 0 - 2

Baskıya Hazırlık
Atlas Kitapçılık Ltd. Şti.
atlas@utstus.com
0 312 432 10 46

Baskı
BRC Ofset Ltd. Şti.
0 312 384 44 54

İZMİR TIP KİTABEVİ
167. sok. No: 12 Bornova İZMİR/35040
Tel: 0 232 342 83 61 Fax: 0 232 388 85 91
e-mail: info@izmirtip.com.tr
www.izmirtip.com.tr

Kapak
Resim, bir hücre çekirdeğinin içerisinde, DNA'yı kopyalayan, onaran ve paketleyen proteinlerden bazılarını da içeren bir bölümü betimlemektedir. DNA iplikleri sarı olarak görülmektedir. Resmin ortasında yukardan aşağıya doğru uzanan bir replikasyon çatalı, DNA polimerazlar tarafından kopyalanan DNA'yı göstermektedir. Resmin sağ ve sol yanlarında RNA polimeraz mesajcı RNA sentezlemekte. Resimdeki DNA'nın büyük bölümü nükleozomlar çevresine sarılmış durumda. Resim, The Scripps Research Enstitüsü'nden David S. Goodsell tarafından hazırlanmıştır.

Kısım I başlık resmi
Sırasıyla kırmızı ve yeşil floresan boyayla boyanmış mikrotübül ve aktin filamanları.
(K.G. Murti / Visuals Unlimited)

Kısım II başlık resmi
Ribozom birimlerinin yüksek rezolüsyonlu X-ışını kristal yapısı.
(N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz, 2000. *Science* 289: 905'den, Thomas A. Seitz'in izniyle)

Kısım III başlık resmi
Kromozom 4 üzerindeki tekrar dizilerine özel problar insan hücresine hibridize edilmiş. Sarı floresansla belirlenmiş 4. kromozomun iki kopyasının nükleus içerisinde ayrı bölgeleri kapladığı görülmekte.
(A. I. Lamond and W. C. Earnshaw, 1998. *Science* 280: 547'den)

Kısım IV başlık resmi
Mitoz anı: Telofaz.
(Conly L. Rieder / Biological Photo Service)

HÜCRE

MOLEKÜLER YAKLAŞIM

ÜÇÜNCÜ BASKI

Bu kitap, bana ilk araştırmamı
nasıl yapacağımı öğreten
Florence Haseltine'a
atfedilmiştir.

G.M.C

ÇEVİRİ EDİTÖRLERİ

Prof. Dr. Meral SAKIZLI – Prof. Dr. Neşe ATABEY

ÇEVİRENLER

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Yrd. Doç. Dr. Esra ERDAL
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Prof. Dr. Gül GÜNER
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya – İzmir

Prof. Dr. Güven LÜLECİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji – Antalya

Yrd. Doç. Dr. H. Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Doç. Dr. Işık YULUĞ
Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Dept. – Ankara

Prof. Dr. Meral SAKIZLI
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Prof. Dr. Nejat DALAY
İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü – İstanbul

Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji – İzmir

Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Doç Dr. Nurten AKARSU
Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü – Ankara

Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Prof. Dr. Şükrüye AYTER
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji – Ankara

Yrd. Doç. Dr. Zeynep SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik – İzmir

Kısa İçerik

Kısım I *Giriş* 1

1 Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bakış 3
Dr. Nejat Topçuoğlu

2 Hücre Kimyası 41
Dr. Gül Güner

3 Moleküler Biyolojinin Temelleri 89
Dr. Nurten Akarsu

Kısım II *Genetik Bilgi Akışı* 137

4 Hücresel Genomların Organizasyonu ve Dizilimleri 139
Dr. Işık Yuluğ

5 Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi 179
Dr. H. Ogün Sercan

6 RNA Sentezi ve İşlenmesi 231
Dr. Çiğdem Eresen

7 Protein Sentezi, İşlenmesi ve Regülasyonu 281
Dr. Şükrüye Ayter

Kısım III *Hücre Yapı ve İşlevi* 321

8 Nükleus 323
Dr. Orhan Terzioğlu

9 Protein Sınıflanması ve Taşınması:
Endoplazmik Retikulum, Golgi Aygıtı ve Lizozomlar 355
Dr. Zeynep Sercan

10 Biyoenerjetik ve Metabolizma: Mitokondri, Kloroplast ve Peroksizomlar 399
Dr. Meral Sakızlı

11 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi 435
Dr. Neşe Atabey

12 Hücre Yüzeyi 483
Dr. Meral Sakızlı - Dr. Güven Lüleci

Kısım IV *Hücre Regülasyonu* 539

13 Hücre Sinyal İletimi 541
Dr. Neşe Atabey

14 Hücre Döngüsü 591
Dr. Esra Erdal

15 Kanser 631
Dr. Nejat Dalay

İçerik

Önsöz xvii
Hücre Organizasyonu ve Özellikleri xix

KISIM I Giriş

1 *Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bakış 3*

HÜCRELERİN KÖKENİ VE EVRİMİ 4
İlk Hücre 4
Metabolizmanın Evrimi 7
Günümüz Prokaryotları 8
Ökaryot Hücreler 9
Çok Hücreli Organizmaların Gelişimi 12

DENEYSEL MODEL OLARAK HÜCRELER 15
E. coli 15
Mayalar 16
Dictyostelium discoideum 17
Caenorhabditis elegans 17
Drosophila melanogaster 18
Arabidopsis thaliana 18
Omurgalılar 19

HÜCRE BİYOLOJİSİNİN GEREÇLERİ 20
Işık Mikroskopisi 21
Elektron Mikroskopisi 25
Hücreyi Alt Bileşenlerine Ayırma 28
Hayvan Hücrelerinin Kültürde Üretilmesi 29
Bitki Hücresi Kültürleri 34
Viruslar 34

ANAHTAR DENEY Hayvan Hücresi Kültürü 32

MOLEKÜLER TIP Viruslar ve Kanser 35

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 37
SORULAR 38
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 39

2 *Hücre Kimyası 41*

HÜCRELERİN MOLEKÜLER BİLEŞİMİ 41
Karbohidratlar 42
Lipidler 44
Nükleik Asitler 47
Proteinler 50

ENZİMLERİN BİYOLOJİK KATALİZÖRLER OLARAK MERKEZİ ROLLERİ 56
Enzimlerin Katalitik Etkinliği 56
Enzimatik Kataliz Mekanizmaları 57
Koenzimler 59
Enzim Aktivitesinin Regülasyonu 61

METABOLİK ENERJİ 63
Serbest Enerji ve ATP 64
Glukozdan ATP Üretimi 66
Diğer Organik Moleküllerden Enerji Sağlanması 71
Fotosentez 72

HÜCRE BİLEŞENLERİNİN BİYOSENTEZİ 74
Karbohidratlar 74
Lipidler 75
Proteinler 76
Nükleik Asitler 79

HÜCRE ZARLARI 80
Zar Lipidleri 80
Zar Proteinleri 81
Hücre Zarlarından Taşıma 83

ANAHTAR DENEY Polipeptid zincirlerinin katlanması 52

MOLEKÜLER TIP Fenilketonüri 79

ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 85
SORULAR 87
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 87

3 *Moleküler Biyolojinin Temelleri 89*

KALITIM, GENLER VE DNA 89
Genler ve Kromozomlar 90
Genler ve Enzimler 91
DNA'nın Genetik Materyal Olarak Tanınması 93
DNA'nın Yapısı 94
DNA'nın Replikasyonu 95

GENETİK BİLGİNİN EKSPRESYONU 96
Genler ile Proteinler Arasında Doğrusal İlişki 97
Mesajcı RNA'nın Rolü 98
Genetik Kod 99
RNA Virusları ve Ters Transkripsiyon 100

REKOMBİNANT DNA 104
Restriksiyon Endonükleazlar 104
Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması 107
Rekombinant DNA Vektörleri 108
DNA Dizi Analizi 111
Klonlanmış Genlerin Ekspresyonu 113
DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Amplifikasyonu 115

NÜKLEİK ASİTLER VE PROTEİNLERİN SAPTANMASI 117
Nükleik Asit Hibridizasyonu 117
Küçük Miktarda DNA veya RNA'nın PCR Yöntemi ile Saptanması 119
Protein Probları Olarak Antikorlar 119
Rekombinant DNA Kütüphanelerinin Taranmasında Kullanılan Problar 121

ÖKARYOTLARDA GEN FONKSİYONU 123
Mayalarda Genetik Analiz 124
Hayvan ve Bitkilerde Gen Aktarımı 125
Klonlanmış DNA'da Mutasyon Oluşturma 128
Hücresel Genlerde Mutasyon Oluşturma 128
ANAHTAR DENEY DNA Provirus Hipotezi 102
MOLEKÜLER TIP HIV ve AIDS 105
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 132
SORULAR 134
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 135

KISIM II Genetik Bilgi Akışı

4 Hücresel Genomların Organizasyonu ve Dizilimleri 139

ÖKARYOT GENOMLARININ KARMAŞIKLIĞI 139
İntronlar ve Eksonlar 141
Tekrarlayan DNA Dizileri 145
Gen Duplikasyonları ve Psödogenler 148
Yüksek Ökaryot Genomlarının Yapısı 149

KROMOZOMLAR VE KROMATİN 150
Kromatin 150
Sentromerler 154
Telomerler 157

TAM GENOM DİZİLERİ 158
Prokaryot Genomları 159
Maya Genomu 161
Caenorhabditis elegans ve *Drosophila melanogaster* Genomları 163
Bitki Geneomları 166
İnsan Genomu 167
ANAHTAR DENEY İntronların Keşfi 142
ANAHTAR DENEY İnsan Genomu 170
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 173
SORULAR 175
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 175

5 Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi 179

DNA'NIN REPLİKASYONU 179
DNA Polimerazlar 180
Replikasyon Çatalı 182
Replikasyonun Doğruluğu 188
Başlangıç Noktaları (orijin) ve Replikasyonun Başlaması 189
Telomerler ve Telomeraz: Kromozom Uçlarının Replikasyonu 191

DNA ONARIMI 192
DNA Hasarının Doğrudan Geri Döndürülmesi 194
Kesip Çıkararak (Eksizyon) Onarım 197
Hata-Eğilimli Onarım 201
Rekombinasyonel Onarım 202

HOMOLOG DNA DİZİLERİ ARASINDA REKOMBİNASYON 204
DNA Molekülleri Kırılma ve Yeniden Birleşme Yoluyla Bir Araya Gelir 205
Homolog Rekombinasyon Modelleri 207
Homolog Rekombinasyonda Görevli Enzimler 209

DNA YENİDEN DÜZENLENMELERİ 211
Bölgeye Özgül Rekombinasyon 211
DNA Aracılar ile Transpozisyon 216
RNA Aracılar ile Transpozisyon 220
Gen Amplifikasyonu 225
ANAHTAR DENEY İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi 218
MOLEKÜLER TIP Kolon Kanseri ve DNA Onarımı 203
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 227
SORULAR 228
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 229

6 RNA Sentezi ve İşlenmesi 231

PROKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON 231
RNA Polimeraz ve Transkripsiyon 232
Represörler ve Transkripsiyonun Negatif Kontrolü 236
Transkripsiyonunun Pozitif Kontrolü 238

ÖKARYOT RNA POLİMERAZLARI VE GENEL TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ 239
Ökaryot RNA Polimerazları 239
Genel Transkripsiyon Faktörleri ve RNA Polimeraz II ile Transkripsiyonun Başlatılması 240
RNA Polimeraz I ve III ile Transkripsiyon 243

ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYONUN DÜZENLENMESİ 244
cis-Etkili Regülatör Dizileri: Promotörler ve Güçlendiriciler 245
Transkripsiyon Düzenleyici Proteinler 249
Transkripsiyon Aktivatörlerinin Yapı ve Fonksiyonu 252
Ökaryotik Represörler (Baskılayıcılar) 254
Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi 256
Transkripsiyonun Kodlanmayan RNA'lar ile Düzenlenmesi 259
DNA Metillenmesi 260

RNA İŞLENMESİ VE DÖNÜŞÜMÜ 262
Ribozomal ve Taşıyıcı RNA'ların İşlenmesi 262
Ökaryotlarda mRNA'nın İşlenmesi 264
Kesip-Ekleme (Splicing) Mekanizmaları 266
Alternatif Kesip-Ekleme 272
RNA Düzeltme (Editing) 273
RNA Yıkımı 274
ANAHTAR DENEY Ökaryot Transkripsiyon Faktörlerinin İzolasyonu 251
ANAHTAR DENEY snRNP'lerin Keşfi 268
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 276
SORULAR 278
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 279

7 Protein Sentezi, İşlenmesi ve Regülasyonu 281

mRNA'NIN ÇEVRİMİ (TRANSLASYON) 281
Taşıyıcı RNA'lar 282
Ribozom 283
Mesajcı RNA'nın Organizasyonu ve Çevirinin Başlaması 289
Çeviri Süreci 290
Çevirinin Düzenlenmesi 296

PROTEİN KATLANMASI VE İŞLENMESİ 298
Şaperonlar ve Protein Katlanması 299
Enzimler ve Protein Katlanması 303
Protein Kesimi 303
Glikozillenmesi 305
Lipidlerin Takılması 307

PROTEİN FONKSİYONUNUN DÜZENLENMESİ 309
Küçük Moleküllerle Düzenlenme 310
Protein Fosforillenmesi 311
Protein–Protein Etkileşimleri 313

PROTEİN YIKIMI 313
Ubikuitin – Proteazom Yolu 313
Lizozomal Proteoliz 315
ANAHTAR DENEY Ribozomal RNA'nın katalitik rolü 288
MOLEKÜLER TIP Antibiyotikler ve Protein Sentezi 292
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 316
SORULAR 318
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 318

KISIM III Hücre Yapısı ve İşlevi

8 Nükleus 323

NÜKLEER ZARF VE NÜKLEUS İLE SİTOPLAZMA ARASINDAKİ TRAFİK 323
Nükleer Zarfın Yapısı 324
Nükleer Por Kompleksi 326
Proteinlerin Nükleusa ve Nükleusdan Seçili Taşınımı 328
Nükleusa Protein Alımının Düzenlenmesi 332
RNA'ların Taşınımı 334

NÜKLEUSUN İÇ DÜZENİ 335
Kromozomlar ve Kromatin İnce Yapısı 335
Nükleusdaki İşlevsel Bölgeler 337

NÜKLEOLUS 339
Ribozomal RNA Genleri ve Nükleolusun Organizasyonu 339
rRNA Transkripsiyonu ve İşlenmesi 342
Ribozom Yapılanması 344

MİTOZ SÜRECİNDE NÜKLEUS 345
Nükleer Zarfın Dağılması 345
Kromozom Yoğunlaşması 348
İnterfaz Nükleusunun Yeniden Oluşması 349
ANAHTAR DENEY Nükleer Yerleşim Sinyallerinin Tanımlanması 330
MOLEKÜLER TIP Nükleer Lamina Hastalıkları 340
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 351
SORULAR 352
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 353

9 Protein Sınıflanması ve Taşınması: Endoplazmik Retikulum, Golgi Aygıtı ve Lizozomlar 355

ENDOPLAZMİK RETİKULUM 355
Endoplazmik Retikulum ve Protein Salgılanması 356
Proteinlerin Endoplazmik Retikuluma Hedeflenmesi 357
Proteinlerin ER Zarına Katılması 362
ER'da Protein Katlanma ve İşlemlenmesi 366
Düz ER ve Lipid Sentezi 369
Protein ve Lipidlerin ER'dan Dışarı Çıkışları 372

GOLGİ AYGITI 374
Golgi'nin Organizasyonu 375
Proteinlerin Golgi İçerisinde Glikozillenmesi 377
Golgi İçindeki Lipid ve Polisakkarid Metabolizması 379
Proteinlerin Golgi Aygıtında Sınıflandırılması ve Dışarı Gönderilmesi 380

VEZİKÜLLE TAŞINMA MEKANİZMASI 382
Veziküler Taşınmayı Anlamaya Yönelik Deneysel Yaklaşımlar 383
Kargo Seçimi, Kaplayıcı Proteinler ve Vezikül Tomurcuklanması 385
Vezikül Kaynaşması 387

LİZOZOMLAR 389
Lizozomal Asit Hidrolazlar 389
Endositoz ve Lizozom Oluşumu 390
Fagositoz ve Otofaji 393
ANAHTAR DENEY Sinyal Hipotezi 360
MOLEKÜLER TIP Gaucher Hastalığı 392
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 394
SORULAR 396
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 396

10 Biyoenerjetik ve Metabolizma: Mitokondri, Kloroplast ve Peroksizomlar 399

MİTOKONDRİLER 399
Mitokondri Organizasyonu ve İşlevi 400
Mitokondrinin Genetik Sistemi 401
Dışarıdan Protein Alımı ve Mitokondrinin Yapılanması 403

OKSİDATİF FOSFORİLASYON MEKANİZMASI 408
Elektron Taşıma Zinciri 408
Kemiozmotik Eşlenme 410
Metabolitlerin İç Zardan Taşınması 414

KLOROPLASTLAR VE DİĞER PLASTİDLER 415
Kloroplast Yapı ve İşlevi 415
Kloroplast Genomu 417
Kloroplast Proteinlerinin İçeri Alınması ve Dağıtımı 418
Diğer Plastidler 420

FOTOSENTEZ 422
Fotosistem I ve II'den Elektron Akışı 422
Döngüsel Elektron Akışı 425
ATP Sentezi 426

PEROKSİZOMLAR 426
Peroksizomların İşlevleri 427
Peroksizom Kurulumu 429
ANAHTAR DENEY Kemiozmotik Teori 412
MOLEKÜLER TIP Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtımsal Optik Nöropatisi 406
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 430
SORULAR 432
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 433

11 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi 435

AKTİN FİLAMANLARININ YAPISI VE ORGANİZASYONU 435
Aktin Filamanların Yapılanması ve Ayrışması 436
Aktin Filamanlarının Düzenlenmesi 440
Aktin Filamanlarının Plazma Zarı ile Bağlantıları 442
Hücre Yüzey Çıkıntıları 445

AKTİN, MİYOZİN VE HÜCRE HAREKETİ 447
Kas Kasılması 447
Aktin ve Miyozinin Kas Dış Hücrelerde Kasılabilir Yapılanmaları 451
Sıra Dışı Miyozinler 453
Hücre Göçü ve Sürünme Hareketi 454

ARA FİLAMANLAR 455
Ara Filaman Proteinleri 455
Ara Filamanların Yapılanması 456
Ara Filamanların Hücre İçi Düzenlenmesi 457
Keratin ve Nörofilamanların Fonksiyonları: Deri ve Sinir Sistemi Hastalıkları 459

MİKROTÜBÜLLER 462
Mikrotübüllerin Yapısı, Yapılanması ve Dinamik Kararsızlığı 462
Sentrozom, Sentriyoller ve Mikrotübül Düzenlenmesi 463
Mitoz Sırasında Mikrotübüllerin Yeniden Düzenlenmesi 466
Mikrotübüllerin Kararlılığı ve Hücre Polaritesi 467

MİKROTÜBÜL MOTORLARI VE HAREKETLERİ 468
Mikrotübül Motor Proteinlerinin Tanımlanması 468
Organel Taşınması ve Hücre İçi Düzenlenme 472
Mitotik Kromozomların Ayrılması 474
Kirpikler ve Kamçılar 474
ANAHTAR DENEY Mutant Keratin Ekspresyonu Anormal Deri Gelişimine Neden Olur 460
ANAHTAR DENEY Kinezin İzolasyonu 470
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 478
SORULAR 480
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 481

12

Hücre Yüzeyi 483

PLAZMA ZARININ YAPISI 483
Fosfolipid Çift Tabaka 483
Zar Proteinleri 486
Zar Proteinlerinin Hareketliliği 490
Glikokaliks 493

KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN TAŞINMASI 494
Pasif Difüzyon 494
Kolaylaştırılmış Difüzyon ve Taşıyıcı Proteinler 495
İyon Kanalları 496
ATP Hidroliziyle Desteklenen Aktif Taşıma 503
İyon Gradienti ile Yürütülen Aktif Taşıma 507

ENDOSİTOZ 510
Fagositoz 510
Reseptör- Aracılıklı Endositoz 511
Endositozda Protein Trafiği 515

HÜCRE DUVARLARI VE HÜCRE DIŞI MATRİS 518
Bakteri Hücre Duvarları 518
Bitki Hücre Duvarları 519
Hücre Dışı Matris 522

HÜCRE-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİ 528
Hücre Adezyon Proteinleri 528
Sıkı Bağlantılar 531
Aralık (gap) Bağlantılar 532
Bitki Hücresi Adezyonu ve Plazmodesmata 533
ANAHTAR DENEY LDL Reseptörü 512
MOLEKÜLER TIP Kistik Fibrozis 509
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 533
SORULAR 535
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 536

KISIM IV **Hücre Regülasyonu**

13

Hücre Sinyal İletimi 541

SİNYAL İLETİMİ MOLEKÜLLERİ VE RESEPTÖRLERİ 541
Hücre-Hücre Sinyal İletimi Tipleri 542
Steroid Hormonlar ve Nükleer Reseptör Süper Ailesi 543
Nitrik Oksit ve Karbon Monoksit 545
Sinirsel İleticiler (Nörotransmiterler) 546
Peptid Hormonlar ve Büyüme Faktörleri 547
Ökosanoidler 548
Bitki Hormonları 549

HÜCRE YÜZEY RESEPTÖRLERİNİN FONKSİYONLARI 550
G Proteini-Eşlikli Reseptörler 551
Reseptör Protein-Tirozin Kinazlar 553
Sitokin Reseptörleri ve Reseptör Olmayan Protein-Tirozin Kinazlar 557
Diğer Enzimatik Aktivitelerle Bağlantılı Reseptörler 557

HÜCRE-İÇİ SİNYAL İLETİ YOLAKLARI 558
cAMP Yolağı: İkinci Mesajcılar ve Protein Fosforilasyonu 559
Siklik GMP 561
Fosfolipidler ve Ca^{2+} 562
Ras, Raf ve MAP Kinaz Yolağı 565
JAK/STAT Yolağı 570

SİNYAL İLETİMİ VE HÜCRE İSKELETİ 571
İntegrinler ve Sinyal İletimi 571
Aktin Hücre İskeletinin Düzenlenmesi 574

GELİŞİM VE FARKLILAŞMA SİNYAL İLETİMİ 575
Drosophila ve C.elegans'daki Reseptör Tirozin Kinaz/Ras/Raf/ERK Yolağı 576
Hedgehog ve Wnt 578
Notch Sinyal İletimi 579

PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DÜZENLENMESİ 579
Kaspazlar ve Apoptoz 580
Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu 582
Hücre Sağkalım Sinyal İletimi 583
ANAHTAR DENEYLER Src Protein Tirozin Kinaz 554
MOLEKÜLER TIP Kanser: Sinyal İletimi ve *ras* Onkogenleri 572
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 584
SORULAR 587
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 588

14

Hücre Döngüsü 591

ÖKARYOT HÜCRE DÖNGÜSÜ 591
Hücre Döngüsünün Evreleri 592
Hücre Döngüsünün Hücre Büyümesi ve Hücre-dışı Sinyaller Tarafından Düzenlenmesi 594
Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları 596
DNA Replikasyonunun, Hücre Döngüsü Başına Bir Kereyle Sınırlanması 598

HÜCRE DÖNGÜSÜ GELİŞİMİNİN DÜZENLEYİCİLERİ 599
MPF: Cdc2 ve Siklin Dimeri 599
Siklin ve Siklin-Bağımlı Kinaz Aileleri 603
Büyüme Faktörleri ve D-Tipi Siklinler 605
Hücre Döngüsü İnhibitörleri 607

M EVRESİ OLAYLARI 608
Mitozun Aşamaları 609
MPF ve Metafaza İlerleme 611
Proteoliz ve MPF'nin İnaktivasyonu: Anafaz ve Telofaz 613
Sitokinez 614

MAYOZ VE DÖLLENME 615
Mayoz Süreci 615
Oosit Mayozunun Düzenlenmesi 618
Döllenme 620

KÖK HÜCRELER VE ERİŞKİN DOKULARIN KORUNMASI 621
Farklılaşmış Hücrelerin Çoğalması 621
Kök Hücreler 622
Kök Hücrelerin Tıpta Kullanımı 624
ANAHTAR DENEY MPF' nin Keşfi 600
ANAHTAR DENEY Embriyonik Kök Hücre Kültürü 622
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 626
SORULAR 628
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 628

15

Kanser 631

KANSERİN GELİŞİMİ VE NEDENLERİ 631
Kanser Türleri 632
Kanserin Gelişimi 633
Kanserin Nedenleri 634
Kanser Hücrelerinin Özellikleri 636
Hücrelerin Kültürde Transformasyonu 640

TÜMÖR VİRUSLARI 640
Hepatit B ve C Virusları 641
SV40 ve Polyoma Virusu 641
Papillomaviruslar 642
Adenoviruslar 643
Herpesviruslar 643
Retroviruslar 644

ONKOGENLER 644
Retroviral Onkogenler 645
Protoonkogenler 646
İnsan Kanserlerinde Onkogenler 649
Onkogen Ürünlerinin İşlevi 653

TÜMÖR BASKILAYICI GENLER 657
Tümör Baskılayıcı Genlerin Tanımlanması 657
Tümör Baskılayıcı Gen Ürünlerinin İşlevleri 660
Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Tümör Gelişimindeki Rolü 663

MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN KANSERDEN KORUNMA VE SAĞALTIM AMACIYLA KULLANILMASI 664
Korunma ve Erken Tanı 664
Moleküler Tanı 665
Sağaltım 666
ANAHTAR DENEY
Protoonkogenlerin Keşfi 648
MOLEKÜLER TIP STI-571:bcr/abl Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi 667
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER 669
SORULAR 671
KAYNAKLAR VE AYRICA OKUNACAKLAR 672

Sorulara Yanıtlar 675

Sözlük 681

Dizin 699

Önsöz

Hücre, yaşam bilimlerinin en hızlı gelişen alanlarından birini kapsamakta ve son baskının yayınlanmış olduğu 2000 yılından sonra bir kaç önemli gelişme gerçekleşti. Özellikle, insan genom dizisinin tamamlanmış olması belirtilmeye değer. İnsan genom dizisi öntaslaklarının 2001 yılında yayınlanmasını takiben, 2003'de, Watson ve Crick'in DNA yapısını tanımlayan, tarihsel makalelerinin yayınlanmasından elli yıl sonra, dizinin yüksek-kalite versiyonu tamamlandı. Birkaç diğer canlının diziniyle birlikte insan genom dizini, bizlerin, tek genlerin nitelendirilmesinin ötesine, genom içerik ve organizasyonunun global görüntüsüne ulaşabilmemizi sağladı. Böyle, genomun tümüne bakış açısı, gen işlevi ve düzenlenmesi çalışmalarına yeni yaklaşım getirecektir ve önümüzdeki yıllarda hücre ve moleküler biyoloji araştırmalarına en büyük etkiyi sürdüreceğine şüphe yoktur.

Hücrenin moleküler biyolojisinin diğer bazı konularının anlaşılmasında da önemli gelişmeler olmuştur. Kromatinin transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen histon modifikasyon modelleri ve gen ekspresyonunu hem transkripsiyon hem de translasyon aşamalarında kontrol eden, kodlamayan RNA'lar gibi, gen ekspresyonunu denetleyen yeni mekanizmalar tanımlandı. Ribozomun, yüksek-çözünürlüklü yapısal analizi, protein sentez düzeneğini, peptid bağının ribozomal RNA tarafından katalizlendiğini şüphe götürmez şekilde göstererek aydınlatmıştır. Ayrıca, protein trafiğinin; nükleusa giriş ve çıkış, mitokondrilere ve kloroplastlara proteinlerin alınma mekanizmaları ve taşıyıcı veziküllerin tomurcuklanması, yanaşması ve kaynaşmasının denetimini de kapsayan çeşitli konularının anlaşılmasında güçlü gelişmeler sağlanmıştır. Hücre sinyal iletimi, hücre çoğalması ve programlı hücre ölümü gibi konuların anlaşılabilmesi çabaları da sürmektedir. Tıpla ilişkili gelişmeler, bir onkogen proteinine karşı tasarlanan ilk ilacın başarıyla geliştirilmiş olması, kanser tanısında gen ekspresyon profillemenin kullanılması ve ayrıca, olası embriyonik kök hücre uygulamaları çevresinde gelişen ilerlemeler ve anlaşmazlıklar gibi konuları içermektedir.

Hücre'nin üçüncü baskısı, bu heyecan verici gelişmeleri kapsayacak şekilde güncellendi. Bununla birlikte, *Hücre*'nin hedefleri ve ayırt edici özellikleri değişmeden kaldı. *Hücre*, hücre ve moleküler biyoloji üzerine ilk kez ders alan mezuniyet öncesi öğrenciler tarafından benimsenebilecek ve kavranacak, kolay ulaşılabilen ve okunabilen bir kitap olmayı halen sürdürmekte. Aynı zamanda,

alanımızdaki araştırma heyecanını ve mücadelesini ortaya çıkarmaya çalıştık. Bu hedef doğrultusunda, kitap boyunca örnek araştırmalar tartışılmış ve okuyana "bilim yapıyor" duygusunu verme amacıyla, her bölümde, temel bir makaleyi ve zeminini detaylarıyla anlatan bir yada iki Anahtar Deney bölümü kapsanmıştır.

Hücre'nin önceki baskılarında olduğu gibi, bu baskısı da; eleştirmenlerin, meslektaşların, eğitmenlerin ve öğrencilerin yorum ve önerilerinden büyük ölçüde yararlanmıştır. Bir kaç eğitmenin önerileri doğrultusunda, bu sayıda Anahtar Deney denemelerinin sayısını artırdık. Yeni Anahtar Deneyler; insan genomu dizilenmesi, snRNP'lerin keşfi, ara filamanların rolünün belirlenmesi ve embriyonik kök hücrelerin izolasyonu konularını kapsamakta ve Craig Venter, Eric Lander, Joan Steitz, Elaine Fuchs ve Gail Martin'in çalışmalarını öne çıkarmaktadır. Buna ek olarak, yeni Moleküler Tıp denemeleri de, nükleer lamina hastalıklarını, kronik miyeloid lösemi tedavisi için onkogene- hedefli ilaç olarak STI-571'in geliştirilmesini ele almaktadır. Ayrıca, hem eğitmenlerden hem de öğrencilerden gelen istek doğrultusunda, konunun bir kez daha gözden geçirilmesini kolaylaştırmak üzere, her bölüm sonundaki soruların sayısını iki katından daha fazla artırdık.

Dennis Goode (Maryland Üniversitesi)'un bu baskıya yapmış olduğu katkıları özellikle belirtmekten mutluluk duyuyoruz. Dennis sadece genişletilmiş bölüm-sonu soruları yazmakla kalmamış, taslak üzerinde bir çok yardımcı öneride de bulunmuştur ve yardımları için müteşekkiriz. Rob Hausman, kitabın düzeltmelerini ve şekil değerlendirmelerini sabırla gerçekleştiren Barbara Susan Wood'a da teşekkür ediyor. ASM Yayın'dan Jeff Holtmeier'a ve Sinauer Ortaklığı'ndan yayıncılarımız Andy Sinauer ve Dean Scudder'a sürekli destekleri için teşekkürlerimizi iletmekten ve *Hücre*'nin üçüncü baskısının düzeltilmesi ve üretimi sürecindeki sabrı, titiz çalışması ve güzel kişiliğini belirtmekten son derece mutluyuz.

GEOFFREY M. COOPER
ROBERT E. HAUSMAN

Hücre
ORGANİZASYONU VE ÖZELLİKLERİ
Moleküler Bir Yaklaşım

Hücre, bir sömestrede tamamlanabilecek ve öğrencilerin kitabın tüm içeriğine hakim olmalarını sağlayacak, anlaşılır ve öğretilebilir bir metin olarak tasarlanmıştır. Öğrencilerin çoğunun daha önce organik kimya, biyokimya veya moleküler biyoloji derslerini almamış, ancak, biyolojiye giriş ve genel kimya derslerini almış olacakları varsayılmıştır. Kitabın organizasyon ve özellikleri bazı yönleriyle öğrencilerin konuya yaklaşmalarına ve anlamalarına yardımcı olacaktır.

ORGANİZASYON

Hücre, her biri kendi içerisinde bütünlenen dört kısma ayrılmıştır, böylece konuların sırası ve önemsenme derecesi, farklı derslerin gerekleri doğrultusunda kolayca değiştirilebilir.

Kısım I, hücrenin evrimi, hücre inceleme yöntemleri, hücre kimyası ve modern moleküler biyolojinin esasları içerikli, temel oluşturan bölümleri kapsar. Ayrıntılı biyolojiye giriş veya daha önceki bir moleküler biyoloji dersinden kuvvetli bir temel edinmiş olan öğrenciler için bu bölümlerin bazı kısımları atlanabilir yada sadece gözden geçirilebilir.

Kısım II, hücre moleküler biyolojisi üzerine odaklanır ve genom organizasyonu ve dizilimi; DNA replikasyonu, onarımı ve rekombinasyon; transkripsiyon ve RNA işlenmesi; proteinlerin sentezi, işlenmesi ve düzenlenmesi konularını işleyen bölümleri kapsar. Bölümlerin sırası genetik bilgi akış yönünü izler (DNA→RNA→protein) ve bu konularda kısa ancak güncel bir bakış açısı sunar.

Kısım III, hücre yapı ve işlevine ilişkin; nükleus, sitoplazmik organeller, hücre iskeleti ve hücre yüzeyini kapsayan bölüm çekirdek bloklarını içerir. Kitabın bu kısmı, Kısım II'deki moleküler biyolojiyi ökaryot bağlamında açıklayan bir nükleus anlatımıyla başlar ve dışa doğru, sitoplazmik organeller ile hücre iskeletinden hücre zarına ilerler. Bu bölümler göreli olarak bağımsızdır ve belli bir ders için daha uygun olacaksa farklı sırada kullanılabilir.

Son olarak, Kısım IV hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümü konularını kapsayan, heyecan verici ve hızlı ilerleyen hücre düzenlenmesi üzerinde odaklanır. Kitabın bu kısmı, temel hücre regülasyon mekanizmalarındaki bozuklukların sonuçlarını irdeleyen bir kanser bölümü ile sonlanır.

ÖZELLİKLER

Öğrencilerin, içeriğe hakim olmalarını ve algılamalarını kolaylaştırmak üzere *Hücre*' ye bazı pedagojik özellikler eklendi. Bu özellikler, bu kitaptan çalışan öğrencileri yönlendirmek üzere aşağıda özetlenmiştir.

Bölüm Organizasyonu. Her bölüm, dört yada beş ana bölmeye ayrılmıştır ve bunlar da daha sonra benzer sayıda alt bölmelere ayrılır. Her bölümün başındaki ana bölmeleri listeleyen bir taslak, içeriğe kısa bir bakış sağlar.

Anahtar Terimler ve Sözlük. Anahtar terimler her bölümde, ilk geçtikleri yerde koyu yazılarak belirlenmiştir. Anahtar terimler bölüm özetinde tekrarlanmakta ve kitabın sonundaki sözlükte tanımlanmaktadır.

Resimler ve Mikroskop Görüntüleri. Metni görüntülerle kuvvetlendirmek ve tamamlamak için bir, çok- renkli eser görüntüleme programı ve mikroskop görüntüleri özenle oluşturuldu.

Anahtar Deneyler ve Moleküler Tıp Denemeleri. Her bölüm iki Anahtar Deney deneme yazısı veya bir Anahtar Deney ve bir Moleküler Tıp deneme yazısı içerir. Bu özellikler öğrencilerin, hem hücre ve moleküler biyolojinin deneysel temellerini hem de bunların modern tıbba uyarlanmasını algılamalarını sağlamak üzere tasarlanmıştır. Bu deneme bölümlerinin öğrenci tartışma seanslarına da uygun bir temel oluşturduğunu düşünüyoruz ki, bu seanslara Anahtar Deneyin temelini oluşturan orijinal makalenin bir derlemesi de eşlik edebilir.

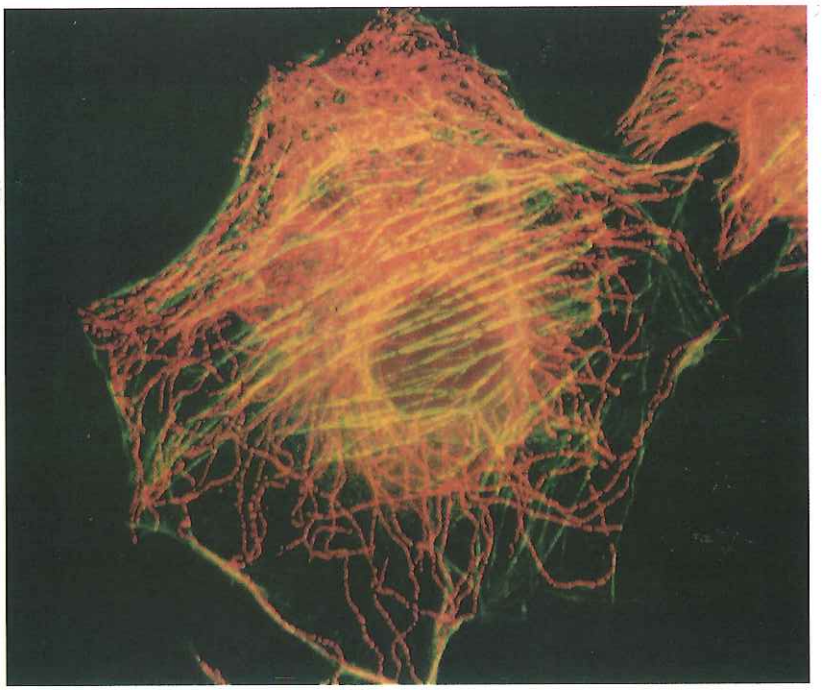
Bölüm Özetleri. Bölüm özetleri, her bölümün en önemli kısım yada alt bölümlerine ait taslaklar şeklinde düzenlenmiştir. Bu bölümlenmiş yapıya her bölümde geçen anahtar terimler listesi eşlik etmektedir, böylece az ve öz ancak ayrıntılı bir gözden geçirme sağlanır.

Sorular ve Yanıtlar. Her bölümün sonunda, o bölümde sunulan bilginin gözden geçirilmesine yardımcı olmak ve öğrencilerin bilgileri kullanarak deneysel verileri ön görmelerini ve yorumlamalarını sağlamak üzere, geniş bir soru seti (tek numaralıların yanıtı kitabın sonundadır) tasarlanmıştır.

Kaynaklar. Her bölümün sonundaki geniş kaynak listesi, belli başlı dergilerden seçilmiş derleme ve makalelere ulaşılmasını sağlar. Öğrencilerin ilgili makaleleri ayırt edebilmelerini kolaylaştırmak için kaynaklar kısım sırasına göre düzenlenmiştir. Derleme makaleler ve temel bildiriler sırasıyla [R] ve [P] kısaltmalarıyla belirlenmiştir.

Kısım I

Giriş



1 Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bakış

2 Hücre Kimyası

3 Moleküler Biyolojinin Temelleri

Bölüm 1

Hücrelere ve Hücre Araştırmalarına Genel Bakış

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi 4

Deneysel Model Olarak Hücreler 15

Hücre Biyolojisinin Gereçleri 20

ANAHTAR DENEY : Hayvan Hücre Kültürü 32

MOLEKÜLER TIP: Virüsler ve Kanser 35

HÜCRELERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİNİ ANLAMAK, tüm biyolojik bilimlere temel olan aktif bir araştırma alanıdır. Bu, sadece temel bilimler açısından değil, aynı zamanda tıpta, ziraatte ve biyoteknolojide gittikçe artan uygulamalar için de doğrudur. Özellikle insan genomunun diziliminin tamamlanmasıyla, hücre ve moleküler biyolojideki gelişmeler tıp uygulamalarında yeni ufuklar açmıştır. Çarpıcı örnekler arasında; kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaya hedeflenmiş özgün ilaçların geliştirilmesi ile, diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, omurga yaralanmaları ve kalp hastalıklarında hasar gören dokunun yerini almak üzere kök hücrelerin kullanılması yer alır.

Hücre ve moleküler biyoloji hızla büyüyen bir araştırma alanı oluşturduğu için, şu andaki bilgi düzeyimiz kadar, bunlara ulaşmamızı sağlayan deneysel temelleri anlamak da önemlidir. Bu nedenle, bu bölümde hücrelerin bazı temel özellikleri yanı sıra, hücrelerin nasıl incelendiği üzerinde de durulacaktır. Hücreler arasındaki farklılıkların ve benzerliklerin ayırdında olmak, hücre biyolojisini anlamada önemli bir yer tutar. Bu bölümün ilk kısmında günümüz hücrelerinin benzerlikleri ve farklılıkları, ortak atadan evrimleştikleri göz önünde bulundurularak tartışılmıştır. Bir yandan, tüm hücreler evrim süresince korunmuş ortak, temel özelliklere sahiptirler. Örnek olarak, tüm hücreler genetik materyel olarak DNA kullanırlar, plazma zarıyla kuşatılmışlardır ve enerji metabolizması için aynı basit mekanizmaları kullanırlar. Diğer yandan, günümüz hücreleri çeşitli farklı yaşam biçimleri geliştirmişlerdir. Bakteri, amip ve maya gibi birçok canlı, kendi başına çoğalabilen tek hücrelerden oluşurlar. Daha karmaşık organizmalar, farklı hücrelerin belirli görevleri yerine getirmek üzere özelleştiği, koordine bir şekilde işlev gören hücre topluluklarından oluşmuştur. Örneğin, insan bedeni, her biri; hafıza, görme, hareket ve sindirim gibi birbirinden farklı işlevler için özelleşmiş 200'den fazla çeşitte hücreye sahiptir. Bir çok farklı tip hücrenin sergiledikleri farklılıklar oldukça çarpıcıdır, insan beyin hücresiyle bir bakteri arasındaki farklılığı bir düşünün.

Farklı tipteki hücrelerin temel benzerlikleri, bir hücre türüne ait deneylerden öğrenilen temel ilkelerin diğer hücre tipleri için de ön görülmesine ve genelleştirilmesine olanak veren, hücre biyolojisinde birleştirici bir tema oluşturur.

Birkaç tip hücre ve organizma, hücre ve moleküler biyolojinin farklı yönlerini incelemek için yaygın bir şekilde kullanılır; bu bölümün ikinci kısmında, söz konusu hücreleri deneysel model olarak değerli yapan bazı özellikleri tartışılmıştır. Sonuç olarak, hücre biyolojisindeki ilerlemelerin, ağırlıklı olarak, bilim adamlarının yeni incelemeler veya yeni tip deneyler yapabilmelerini sağlayan deneysel gereçlerin varlığına bağlı olduğu bilinmelidir. Bu nedenle bu giriş bölümü, hücre yapı ve işlevi hakkında bugünki anlayışa ulaşmamızı sağlayan bazı tarihsel gelişmelerin derlenmesi ve hücre çalışmalarında kullanılan bazı deneysel yaklaşımların tartışılmasıyla sonlanmaktadır.

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi

Hücreler, önceleri çekirdek içerip içermediklerine göre tanımlanan iki ana sınıfa ayrılır. **Prokaryot hücreler** (bakteriler) nükleer kılıftan yoksundurlar; **ökaryot hücreler,** içindeki genetik maddeyi sitoptoplazmadan ayıran bir nükleusa sahiptir. Prokaryot hücreler genellikle ökaryot hücrelerden daha küçük ve daha basit yapılıdırlar; nükleusdan yoksun olmaları yanı sıra, genomları daha az karmaşıktır, sitoplazmik organellere ve hücre iskeletine sahip değildirler (Tablo 1.1). Bu farklılıklara rağmen, günümüz tüm hücrelerinin, başlangıçtaki tek bir ortak atadan türediklerini belirtir şekilde, hem prokaryotların hem de ökaryotların yaşamı aynı temel moleküler mekanizmalarla yönetilir. İlk hücre nasıl oluştu? Günümüz hücrelerinin karmaşıklığı ve farklılıkları nasıl gelişti?

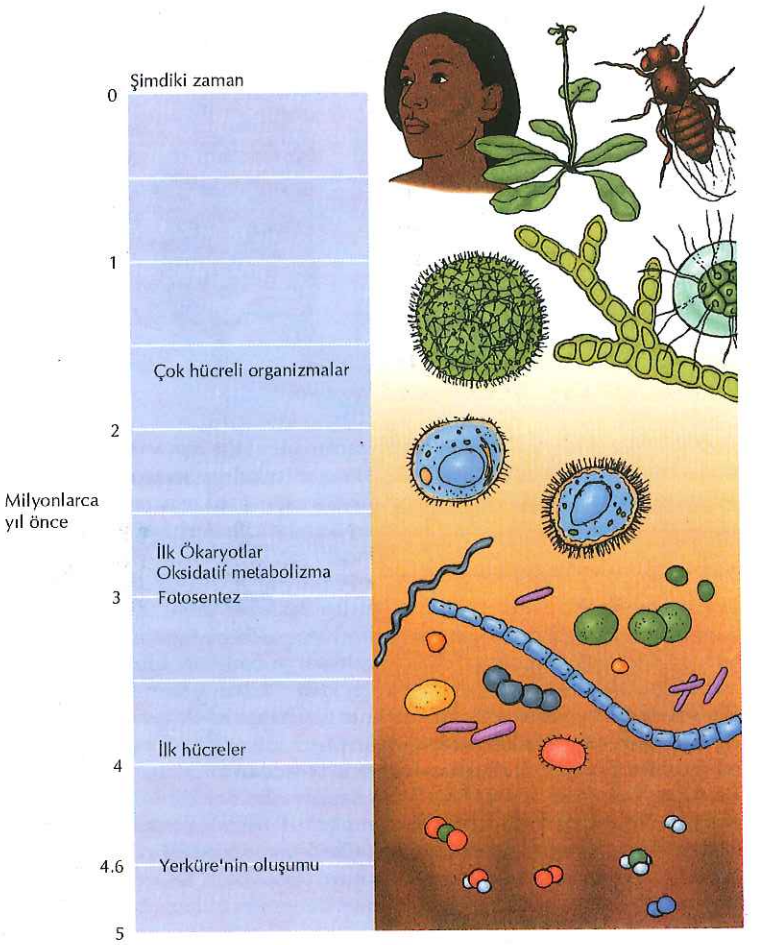
İlk Hücre

Öyle görülüyor ki yaşam ilk olarak, en az 3.8 milyar yıl önce, Yerküre'nin oluşumundan yaklaşık 750 milyon yıl sonra ortaya çıktı (Şekil 1.1). Yaşamın nasıl ortaya çıktığı ve ilk hücrenin nasıl oluştuğu, bu olaylar laboratuvarlarda tekrarlanamadığı için hep bir spekülasyon konusu olmuştur. Bununla birlikle, bir kaç deneysel yöntem, sürecin bazı aşamalarına ilişkin önemli kanıtlar sağlamıştır.

İlkel Yerküre atmosferinde var olduğu düşünülen koşullarda basit organik moleküllerin oluşabildiği ve kendi kendine makro moleküllere polimerize oldukları ilk kez 1920'li yıllarda belirtilmiştir. Yaşamın oluşmaya başladığı zamanda, Yerküre atmosferinin çok az veya hiç

TABLO 1.1 Prokaryot ve Ökaryot Hücreler

Özellik	Prokaryot	Ökaryot
Nükleus	Yok	Var
Tipik bir hücrenin çapı	≈1μm	10 – 100 μm
Hücre iskeleti	Yok	Var
Sitoplazmik organeller	Yok	Var
DNA içeriği (baz çifti)	1×10^6 ila 5×10^6	1.5×10^7 ila 5×10^9
Kromozom	Tek çembersel DNA molekülü	Çok sayıda doğrusal DNA molekülleri

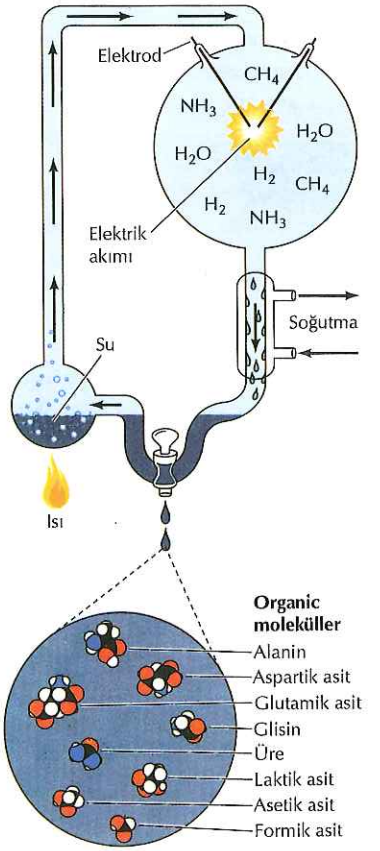


Şekil 1.1 Evrim zaman skalası
Skala, hücrelerin evriminde önemli olayların olduğu düşünülen yaklaşık zamanları göstermektedir.

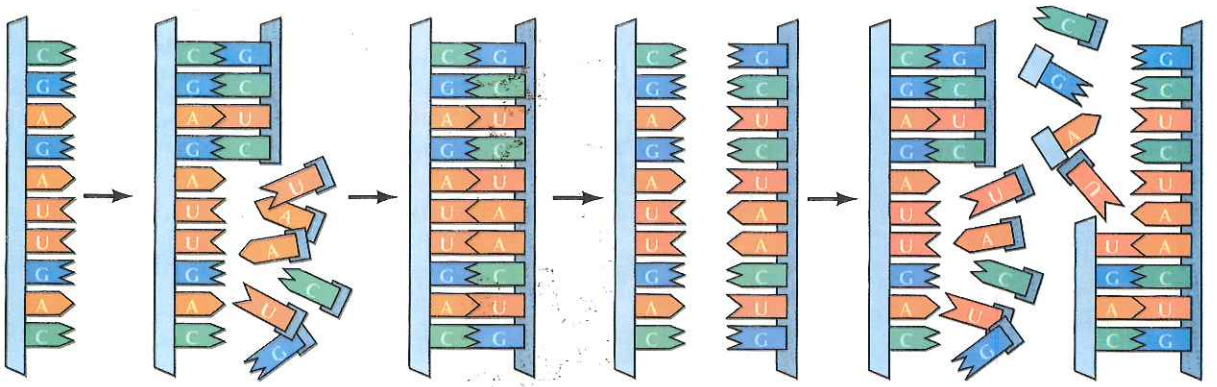
serbest oksijen içermediği, esas olarak CO_2 ve N_2 den ibaret olduğu ve daha az miktarlarda H_2, H_2S ve CO gibi gazları içerdiği düşünülmektedir. Böyle bir atmosfer, güneş ışını veya elektrik boşalması gibi bir enerji verildiğinde, organik moleküllerin kendiliğinden oluşabildiği, redükleyici bir ortam sağlar.

Organik moleküllerin kendiliğinden oluşumları, deneysel olarak ilk kez 1950'lerde, Stanley Miller'ın (o zamanlar lisansüstü öğrenci) su varlığında, H_2, CH_4 ve NH_3'den oluşan bir karışıma elektriksel kıvılcımlar göndererek, bazı amino asidler de dahil çeşitli organik moleküllerin oluştuğunu göstermesiyle kanıtlanmıştır (Şekil 1.2). Her ne kadar, Miller'ın deneyleri ilkel Yerküre şartlarını tam olarak karşılamıyorsa da, ilk canlı organizmaların ortaya çıkışına temel materyal sağlayan organik moleküllerin kendiliğinden sentezlendiğine inanılabileceğini açıkça ortaya koymuştur.

Evrimde ikinci basamak makromoleküllerin oluşumudur. Makromoleküllerin monomerik yapı taşlarının, makul prebiotic koşullarda kendi kendilerine polimerleştikleri gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Organik moleküllerin kendiliğinden oluşumu
Elektrik kıvılcımları verilen CH_4, NH_3 ve H_2'den oluşmuş bir atmosfere su buharı püskürtüldü. Reaksiyon ürünlerinin analizi, alanin, aspartik asit, glutamik asit ve glisin dahil çeşitli organik moleküllerin oluşumunu ortaya çıkardı.

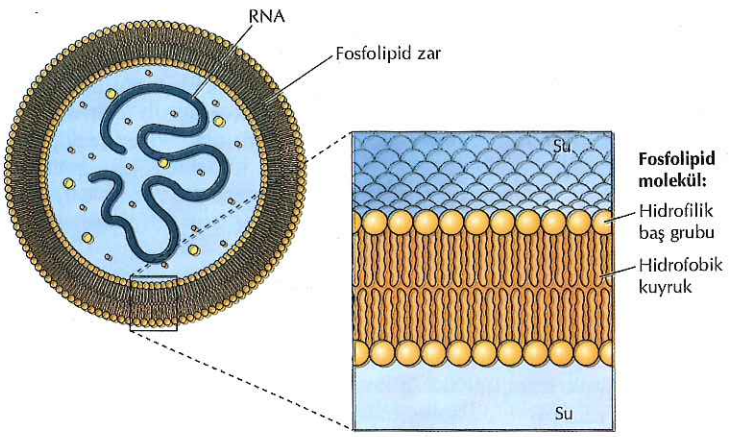


Şekil 1.3 RNA'nın kendini - eşlemesi
Nükleotidler arasında tamamlayıcı eşleşmeler (adenin [A] ile urasil [U] ve guanin [G] ile sitozin [C]) RNA ipliğinin kalıp olarak üzerine tamamlayıcı dizide yeni bir iplik sentezlenmesine imkan sağlar.

Örneğin, kuru amino asit karışımlarının ısıtılması, polipeptidlere polimerize olmalarına yol açar. Ancak, yaşamın başlangıcını sağlayan makromolekülün önemli özelliğinin, kendini kopyalama yetisi olması beklenir. Sadece, kendi yeni kopyalarının sentezini yapabilecek bir makro molekül çoğalabilme ve daha fazla evrimleşme yeteneğine sahip olacaktır.

Günümüz hücrelerinde bulunan en önemli iki majör bilgi taşıyan makromolekül sınıfından (nükleik asitler ve proteinler), sadece nükleik asitler kendi kendini-eşleme yeteneğine sahiptirler. Nükleik asitler, tamamlayıcı nükleotidlerin özgül eşleşmesi sayesinde kendi sentezlerine kalıplık yapabilirler (Şekil 1.3). Moleküler evrimin anlaşılmasında kritik bir aşamaya, 1980'li yılların başında, Sid Altman ve Tom Cech'in laboratuvarlarında RNA'nın, nükleotid polimerleşmesi da dahil bazı kimyasal reaksiyonları katalizleyebildiğinin gösterilmesiyle ulaşıldı. Daha sonraki çalışmalar, RNA'nın bilinen katalitik aktivitelerinin alanını genişletmiş, bir RNA kalıbından yeni bir RNA ipliğinin sentezini yöneten RNA molekülleri tanımlanmıştır. Böylece RNA, benzersiz şekilde, hem kendi replikasyonunu katalizleyip hem de kendi sentezine kalıplık yapabilmektedir. Sonuç olarak, RNA'nın ilk genetik sistem olduğuna inanılmakta ve kimyasal evrimin erken evrelerinin kendini eşleyen RNA moleküllerinden temel aldığı sanılmaktadır –**RNA dünyası** olarak adlandırılan bir dönem. RNA ile amino asitlerin kurala bağlı etkileşimleri daha sonraları günümüz genetik şifresine gelişmiş, nihayet genetik madde olarak DNA RNA'nın yerini almıştır.

İlk hücrenin, kendini eşleyen RNA'nın, **fosfolipidlerden** oluşan bir zarla kuşatılmasıyla ortaya çıktığı varsayılmaktadır (Şekil 1.4). Bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışıldığı üzere, fosfolipidler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin plazma zarları da dahil olmak üzere, günümüz biyolojik zarlarının temel bileşenidir. Zar oluşturan fosfolipidlerin en önemli özellikleri **amfipatik** moleküller olmalarıdır, bunun anlamı, molekülün bir kısmı suda çözünebilirken diğer kısmının çözünmemesidir. Fosfolipidlerin, fosfat içeren ve suda çözünen (**hidrofilik**) baş gruplarıyla bunlara bağlı, suda-çözünmeyen (**hidrofobik**) uzun hidrokarbon zincirleri bulunur. Suya konulduğunda fosfolipidler kendiliklerinden, fosfat içeren baş grupları dışta suyla temasta, hidrokarbon kuyrukları içeride birbirleriyle temas edecek biçimde bir çift tabaka oluşturmak üzere bir araya toplanırlar. Böyle



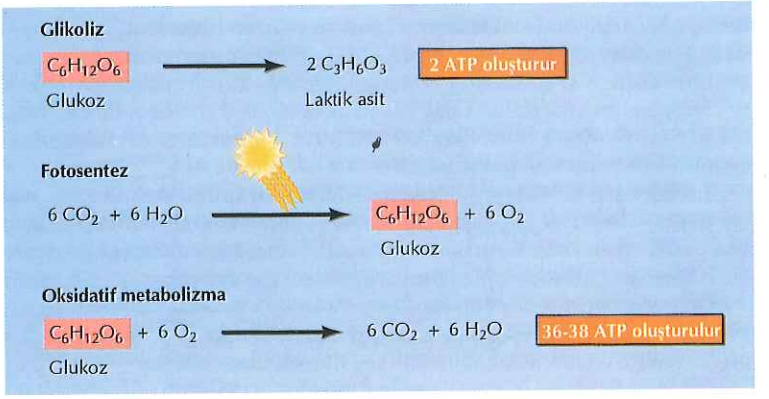
Şekil 1.4 Kendini eşleyen RNA'nın bir fosfolipid zar ile kuşatılması
İlk hücrenin, kendini eşleyen RNA'nın ve ilişkili moleküllerin, fosfolipidlerden oluşan bir zarın içinde kuşatılmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Her bir fosfolipid molekülü hidrofilik bir baş gruba bağlı iki uzun hidrofobik kuyruğa sahiptir. Hidrofobik kuyruklar lipid çift tabakaya gömülürken, hidrofilik başlar zarın her iki yanında suya açıktır.

bir fosfolipid çift tabakası, iki sulu bölme arasında dayanıklı bir bariyer oluşturur – örneğin; hücrenin iç kısmını dış çevresinden ayıran.

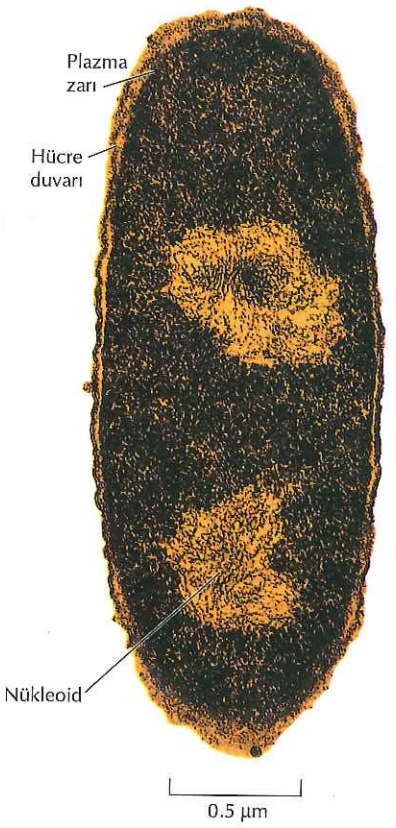
Kendini eşleyen RNA'nın ilişkili diğer moleküllerle birlikte fosfolipid zar içerisine alınması, kendini çoğaltabilen ve daha ileri evrimleşebilen bir birim olarak korunmalarını sağlamıştır. Aynı zamanda RNA-yönetimli protein sentezi de gelişmiş olabilir ve bu durumda, ilk hücrenin, kendini-eşleyen RNA ile onun kodladığı proteinlerden oluştuğu söylenebilir.

Metabolizmanın Evrimi

Hücreler, bir organik moleküller denizinden köken aldıkları için, besin ve enerjiyi doğrudan sağlayabiliyorlardı. Bu durum süremezdi ve hücrelerin, enerji elde etmek ve çoğalmak için gerekli molekülleri sentezleyecek mekanizmalar geliştirmeleri gerekliydi. Metabolik enerjinin elde edilmesi ve denetimli kullanımı tüm hücresel aktivitelerin temelidir ve enerji metabolizmasının ana yolakları (Bölüm 2'de detaylarıyla ele alındı) günümüz hücrelerinde büyük oranda korunmuştur. Tüm hücreler, hücresel bileşenlerini sentezlemek ve hareket gibi enerji gerektiren diğer etkinliklerini sürdürmek için, metabolik enerji kaynağı olarak adenozin 5'-trifosfat (ATP) kullanırlar. Hücrelerin ATP üretimi için kullandıkları mekanizmalar; glikoliz, fotosentez ve oksidatif metabolizmanın evrimsel gelişimi şeklinde üç aşamada ortaya çıkmıştır (Şekil 1.5). Bu metabolik yolakların gelişimi Yerküre atmosferini değiştirmiş ve evrimin yönünü etkilemiştir.



Şekil 1.5 Metabolik enerji üretimi
Glikoliz, glukozun laktoza anaerobik yıkımıdır. Fotosentez, güneş enerjisini CO_2 ile H_2O dan glukozun sentezlenmesini sağlamak için kullanır ve bu arada yan ürün olarak O_2 açığa çıkar. Fotosentezden çıkan O_2, glukozun glikolizde elde edilenden çok daha fazla enerji açığa çıkartarak CO_2 ve H_2O'ya yıkıldığı oksidatif metabolizmada kullanılır.



Şekil 1.6 *E. Coli*'nin elektron mikroskop görüntüsü
Hücre, bir hücre duvarıyla çevrilidir ve bunun içinde plasma zarı bulunur. DNA nükleoid içinde yer almaktadır. (Menge ve Wurtz / Biozentrum, University of Basel / Science Photo Library / Photo Researchers, Inc.)

Yerküre'nin başlangıçtaki anaerob atmosferinde, enerji üreten ilk reaksiyonların, organik moleküllerin oksijen yokluğunda parçalanmasını kapsadığı varsayılıyor. Bu reaksiyonlar olasılıkla, glukozun, net iki ATP molekülü kazancıyla laktik aside anaerob yıkımı olan günümüz **glikoliz** reaksiyonlarının bir biçimiydi. Tüm günümüz hücrelerinin, hücre içi kimyasal enerji kaynağı olarak ATP kullanmaları ve glikoliz yapıyor olmaları bu reaksiyonların evrim sürecinde oldukça erken ortaya çıktıkları görüşüyle uyuşmaktadır.

Glikoliz, önceden oluşan organik moleküllerin (örn., glukoz) yapılarındaki enerjinin, daha sonra metabolik reaksiyonların yürütülmesi için enerji kaynağı olarak kullanılacak olan ATP'ye dönüşebilmesi için bir mekanizma sağlamıştır. Hücreleri, önceden yapılmış organik molekülleri kullanma zorunluluğundan kurtararak güneş ışınının enerjisini alabilmelerini sağlayan **fotosentezin** ortaya çıkışının evrimde ikinci önemli aşama olduğu kanısı yaygındır. Bundan 3 milyar yıl önce ortaya çıkmış olan ilk fotosentetik bakteri, CO_2'i organik moleküllere dönüştürmek için olasılıkla H_2S kullanmıştı – bu fotosentez yolu bazı bakterilerce halen kullanılmaktadır. CO_2'in organik bileşiklere dönüştürülmesinde elektron ve hidrojen vericisi olarak H_2O'nun kullanılması evrimde daha sonra ortaya çıkmış ve Yerküre atmosferinin değişimi gibi önemli bir sonuca neden olmuştur. Yerküre'nin atmosferinde bolca O_2 olmasının nedeni, H_2O'nun fotosentetik reaksiyonlarda kullanımında yan ürün olarak serbest O_2 üretmesidir.

Fotosentezin sonucu olarak O_2'in serbest kalmasının, hücrelerin evrimleştiği ortamı değiştirdiği ve **oksidatif metabolizmanın** gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir. Alternatif olarak, oksidatif metabolizma fotosentezden önce ortaya çıkmış, daha sonra atmosferik O_2'nin artması, enerji üretim reaksiyonlarında O_2 kullanan organizmalara etkin seçici avantaj sağlanmıştır. Her iki durumda da, O_2 oldukça reaktif bir moleküldür ve bu reaktiviteyi kullanan oksidatif mekanizma, organik moleküllerden enerji elde edilmesinde glikolizden çok daha etkin bir mekanizmadır. Örneğin,; glukozun CO_2 ve H_2O'ya tam, oksidatif yıkımı, anaerobik glikolizle üretilen 2 ATP ye karşın, 36 ila 38 ATP molekülüne eşit enerji sağlar. Günümüz hücreleri, birkaç istisna dışında, temel enerji kaynağı olarak oksidatif reaksiyonları kullanmaktadırlar.

Günümüz Prokaryotları

Çeşitli bakteri tiplerini kapsayan günümüz prokaryotları iki gruba ayrılırlar, bunlar, evrimin erken aşamalarında birbirinden ayrılan **arkebakteriler ve öbakterilerdir.** Bazı arkebakteriler, bugün için alışılmadık olan ancak ilkel Dünya'da yaygınlaşmış olabilecek aşırı ortamlarda yaşarlar. Örneğin; termoasidofiller, 2 gibi düşük pH değerlerindeki ve yaklaşık olarak 80°C'deki sıcak sülfür kaynaklarında yaşarlar. Öbakteriler, günümüz genel bakteri formlarını kapsar, bunlar büyük bir canlı grubu olup, toprak, su ve diğer organizmalar gibi çok geniş bir dizi ortamda yaşarlar.

Bakteri hücrelerinin çoğu, 1–10µm çapında küresel, çubuk şeklinde veya spiral şeklindedir. DNA içerikleri 0.6 milyon ila 5 milyon baz çifti arasındadır ve bu büyüklük, 5000 farklı proteini kodlamak için yeterlidir. En büyük ve en gelişmiş prokaryotlar, fotosentez mekanizması gelişmiş olan **siyanobakteriler** dir.

Tipik bir prokaryot hücre yapısı, insan barsak kanalında doğal olarak bulunan ***Escherichia coli (E. coli)*** ile simgelenmiştir (Şekil 1.6). Hücre, yaklaşık olarak 1µm çapında ve 2µm uzunluğunda bir

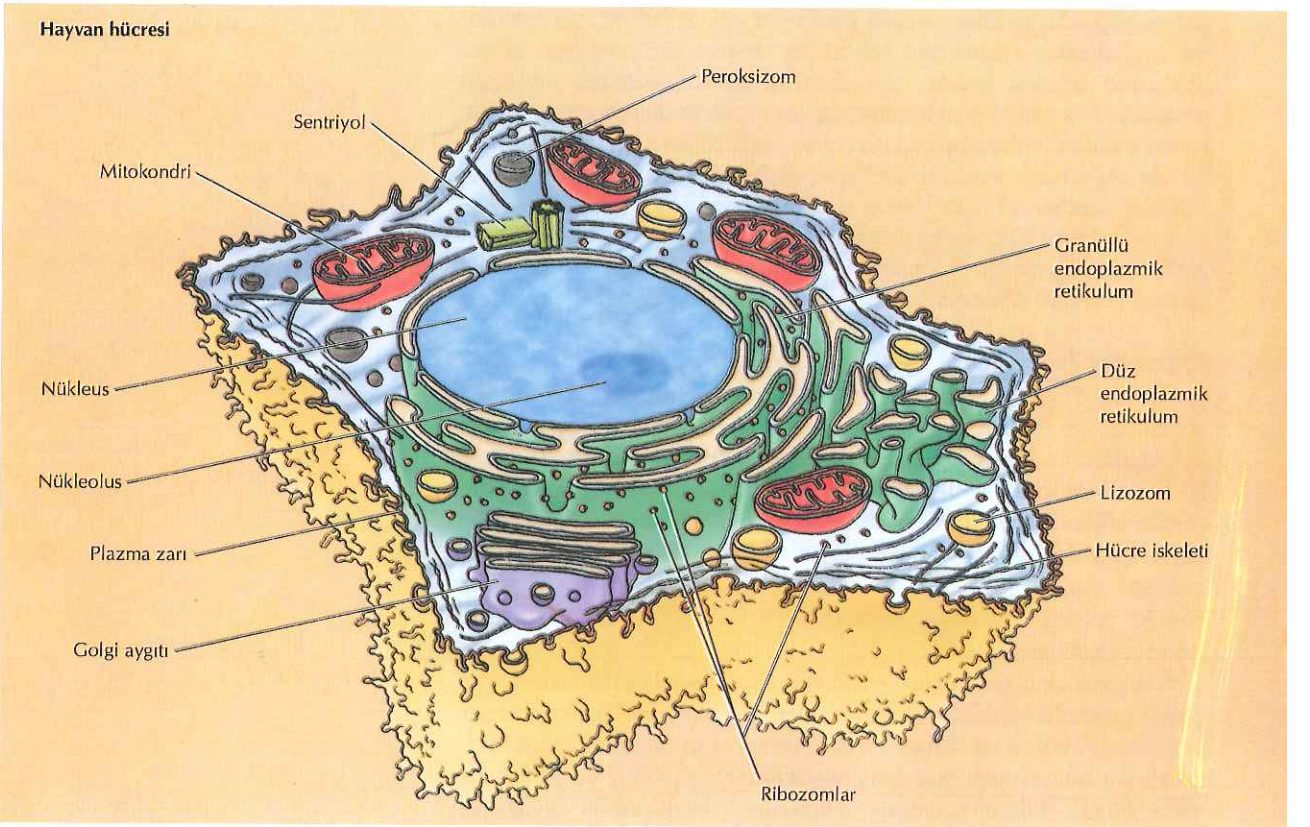
çubuk şeklindedir. Diğer birçok prokaryot gibi *E.coli* de, polisakkarit ve peptidlerden oluşan sert bir **hücre duvarı** ile çevrilidir. Hücre duvarının hemen içinde, çift tabakalı fosfolipitlerden ve bağlı proteinlerden oluşan **plazma zarı** bulunur. Hücre duvarı gözenekli ve çeşitli moleküller tarafından kolayca geçilebilirken; plazma zarı, hücre içi ile dış ortam arasında fonksiyonel bir engel oluşturur. *E. coli* DNA'sı nükloeoid içerisinde, tek bir çembersel moleküldür ve ökaryotik hücre nükleusunun aksine, DNA'yı sitoplazmadan ayıran bir zarla kuşatılmamıştır. Sitoplazma, granüler görünümüne neden olan, yaklaşık 30 000 **ribozom** (protein sentez bölgeleri) içerir.

Ökaryot Hücreler

Prokaryot hücreler gibi tüm ökaryot hücreler plazma zarları ile çevrilidir ve ribozom içerirler. Ancak, ökaryot hücreler daha karmaşıktır ve bir nukleus, çeşitli sitoplazmik organeller ve hücre iskeletine sahiptir (Şekil 1.7). Ökaryot hücrelerin en büyük ve göze çarpan organeli 5 μm çapındaki, hücrenin genetik bilgisini, çembersel değil doğrusal şekilde organize olmuş DNA moleküllerini içeren **nukleus** dur. Nukleus, DNA replikasyonunun ve RNA sentezinin olduğu bölgedir, RNA'nın proteinlere translasyonu sitoplazmadaki ribozomlarda gerçekleşir.

Nükleusa ek olarak, ökaryot hücreler sitoplazmalarında zarla çevrili çeşitli organeller içerirler. Bu organeller, farklı metabolik aktivitelerin yer aldığı bölmeler oluştururlar. Ökaryotik hücreler genellikle prokaryot hücrelerden çok daha büyüktürler, genellikle en az bin kat daha büyük hücre hacmine sahiptirler. Sitoplazmik organeller tarafından oluşturulan bölümleşme, ökaryot hücrelerin etkili bir biçimde görevlerini yerine getirmelerini sağlar. Bu organellerden ikisi, **mitokondriler ve kloroplastlar** enerji metabolizmasında önemli rol oynarlar. Hemen hemen tüm ökaryot hücrelerde bulunan mitokondriler oksidatif metabolizmanın gerçekleştiği yerlerdir ve bu nedenle, organik moleküllerin parçalanması sonucu ortaya çıkan ATP'nin çoğunun üretiminden sorumludurlar. Kloroplastlar, fotosentezin gerçekleştiği bölgelerdir ve sadece bitki ve yeşil alglerin hücrelerinde bulunurlar. **Lizozomlar ve peroksizomlar** da sırasıyla, makromoleküllerin sindirimi ve çeşitli oksidatif reaksiyonlar için özelleşmiş metabolik bölmeler oluştururlar. Buna ek olarak, bitki hücrelerinin çoğu, makromoleküllerin parçalanması ve hem artık ürünlerin hem de besinlerin depolanması gibi çok çeşitli görevleri yerine getiren **vakuolleri** içerirler.

Ökaryot hücrelerin büyüklüklerinden ve karmaşıklıklarından dolayı, hücre içerisinde proteinlerin doğru hedefe taşınması zorlu bir iştir. İki sitoplazmik organel, **endoplazmik retikulum** ve **Golgi aygıtı** özellikle; salgılanacak, plazma zarına yerleşecek ve lizozomlara alınacak olan proteinlerin sınıflandırılması ve taşınmasına adanmışlardır. Endoplazmik retikulum, nukleer zardan sitoplazmanın her yanına uzanan, kapsamlı bir hücre içi zar ağıdır. Sadece proteinlerin işlenmesinde ve taşınımında değil, lipidlerin sentezinde de görevlidirler. Proteinler endoplazmik retikulumdan, daha ileri işleme tabi tutuldukları ve gidecekleri yere taşınmak üzere sınıflandırıldıkları Golgi aygıtına küçük zarlar içinde taşınırlar. Proteinlerin taşınımındaki bu rollerine ek olarak Golgi aygıtı, lipid sentezinde ve (bitki hücrelerinde) hücre duvarını meydana getirecek bazı polisakkaritlerin sentezinde de görevlidir.



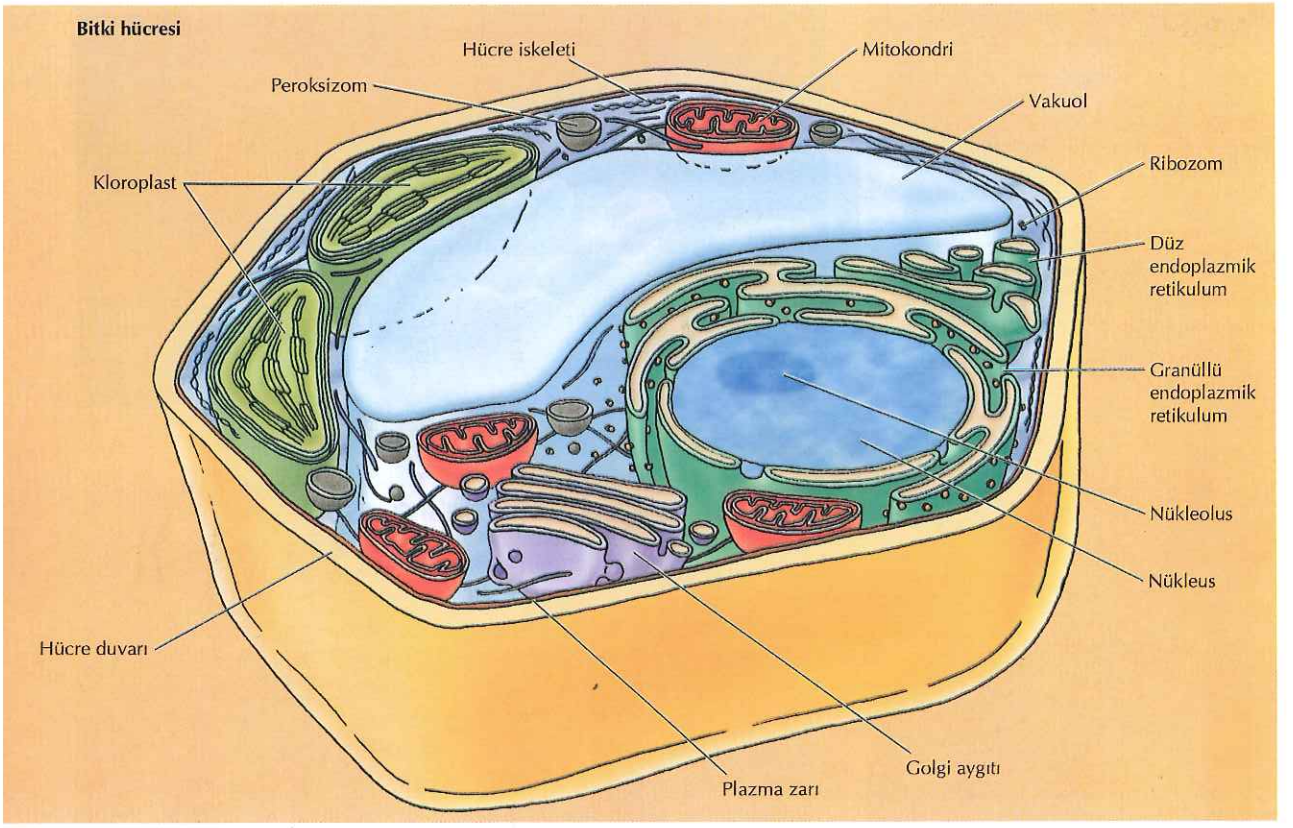
Şekil 1.7 Hayvan ve bitki hücrelerinin yapıları
Hayvan ve bitki hücrelerinin her ikisi de bir plazma zarıyla çevrilmiştir ve nükleus, hücre iskeleti ve bir çok ortak sitoplazmik organel içerirler. Bitki hücreleri bir hücre duvarıyla da kuşatılmışlardır ve kloroplastlarla büyük vakuoller içerirler.

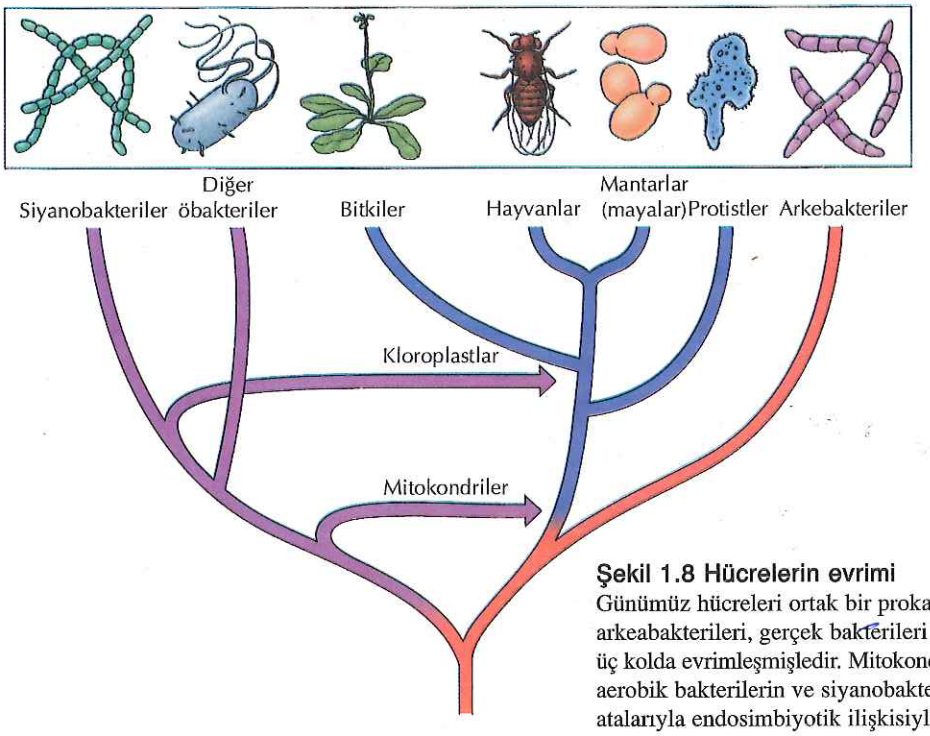
Ökaryot hücreler diğer bir iç organizasyon düzeyine daha sahiptirler: sitoplazmada boydan boya uzanan protein ipliklerinden oluşmuş bir ağ şeklindeki **hücre iskeleti.** Hücre iskeleti, hücrenin şeklini ve sitoplazmanın genel organizasyonunu belirleyerek hücrenin yapısal çatısını oluşturur. Ayrıca, hücre iskeleti hücrelerin hareketinden (örn., kas hücrelerinin kasılması) ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketi dahil, organellerin ve diğer yapıların hücre içinde taşınmaları ile yerleştirilmelerinden sorumludur.

Ökaryotlar, 2.7 milyar yıl kadar önce, 1 ila 1.5 milyar yıllık prokaryotik evrimi takiben ortaya çıkmışlardır. DNA dizilimlerinin analizi arkebakteriler ile öbakterilerin birbirlerinden, her hangi birinin günümüz ökaryotlarından olduğu kadar, farklı olduklarını göstermektedir. Buna göre, günümüz arkebakterilerini, öbakterilerini ve ökaryotlarını oluşturmak üzere ortak bir atadan üç kolun ayrılmasının evrimde çok erken bir olay olduğu anlaşılmaktadır. İlginç bir şekilde, arkebakterilerin genlerinin bir çoğu ökaryotlarınkine öbakterilerinkinden daha fazla benzer. Bu durum, arkebakteriler ile ökaryotların ortak evrimsel soy hattını paylaştıklarını ve birbirlerine, herhangi birinin öbakteriye olduğundan daha yakın akraba olduklarını belirtir (Şekil 1.8).

Ökaryot hücrelerin evriminde en kritik aşama, zarla- çevrili organellerin edinilmesi ve böylece bu hücrelerin kompleks yapısının gelişiminin sağlanmasıdır. Bu organellerin, prokaryot hücrelerin ökaryotların atalarıyla ilişkileri sonucunda kazanılmış oldukları düşünülmektedir.

Ökaryot hücrelerin, prokaryotların simbiyotik ilişkilerinden-**endosimbiyoz**-doğmuş oldukları hipotezi özellikle, büyük hücreler

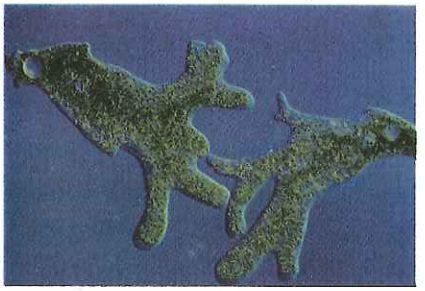




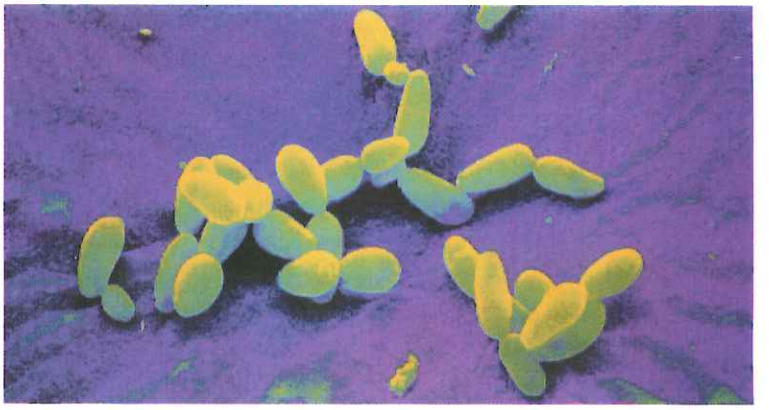
Şekil 1.8 Hücrelerin evrimi
Günümüz hücreleri ortak bir prokaryotik atadan, arkeabakterileri, gerçek bakterileri ve ökaryotları da oluşturan üç kolda evrimleşmişledir. Mitokondri ve kloroplastlar sırasıyla, aerobik bakterilerin ve siyanobakterilerin ökaryotların atalarıyla endosimbiyotik ilişkisiyle ortaya çıkmışlardır.

TABLO 1.2 Hücrelerin DNA içeriği

Organizma	Haploid DNA içeriği (milyon baz çifti)
Bakteriler	
Mycoplasma	0.6
E.coli	4.6
Tek hücreli ökaryotlar	
Saccharomyces cerevisiae (maya)	12
Dictyostelium discoideum	70
Öglena	3000
Bitkiler	
Arabidopsis thaliana	125
Zea mays (mısır)	5000
Hayvanlar	
Caenorhabditis elegans (yer solucanı)	97
Drosophila melanogaster (meyva sineği)	180
Tavuk	1200
Zebra balığı	1700
Fare	3000
İnsan	3000



Şekil 1.10 ***Amoeba proteus*'un ışık mikroskobu görüntüsü**
(M.I. Walker / Photo Researchers, Inc.)



Şekil 1.9 ***Saccharomyces cerevisiae*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü**
Mikrograf yapay renklendirilmiştir. (Andrew Syed / Science Photo Library / Photo Researches, Inc.)

içerisinde barınan bakterilerden geliştikleri düşünülen mitokondri ve kloroplastların incelenmesiyle desteklenmiştir. Hem mitokondri hem de kloroplastlar büyüklük olarak bakterilere çok benzemektedir ve aynı bakterilerde olduğu gibi ikiye bölünerek çoğalırlar. En önemlisi de, hem mitokondriler hem de kloroplastlar bazı bileşenlerini kodlayan kendi DNA'larına sahiptirler. Organelin her bölünüşünde bu mitokondri ve kloroplast DNA'ları da kendini eşler ve kodladığı genler organel içerisinde transkribe olur ve organel ribozomlarında translasyonu yapılır. Böylece mitokondri ve kloroplastlar, hücrenin nükleer genomundan ayrı olarak kendi genetik sistemlerine sahiptirler. Ayrıca, bu organellerin ribozomları ve ribozomal RNA'ları, ökaryotların nukleer genomuyla kodlananlar ile karşılaştırıldığında, bakterilerinkiyle daha yakından ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu organellerin endosimbiyotik kökeni bugün genel kabul görmektedir. Buna göre, mitokondrilerin aerobik bakterilerden, kloroplastların da siyanobakteriler gibi fotosentetik bakterilerden evrimleştikleri düşünülmektedir. Aerob bakterilerin kazanılması anaerob hücrelere oksidatif metabolizma gerçekleştirme yeteneği sağlamıştır. Fotosentetik bakterilerin kazanılması ise, fotosentez yapma yeteneği sayesinde besinsel bağımsızlık sağlamıştır. Bu nedenle, bu endosimbiyotik birliktelikler partnerlerine büyük ölçüde avantaj sağlamış ve evrim sürecinde korunmuşlardır. Başlangıçta bu bakterilerde bulunan genlerin çoğu, zamanla hücrenin nukleer genomuna katılmıştır ve bu nedenle mitokondri ve kloroplastlarının sadece birkaç bileşeni halen organel genomları tarafından kodlanmaktadır.

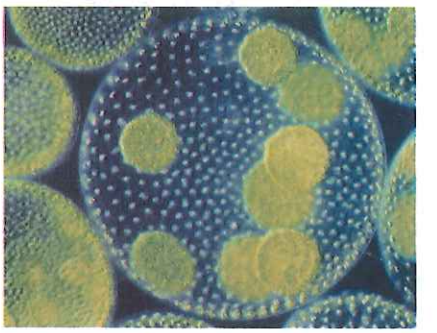
Çok Hücreli Organizmaların Gelişimi

Ökaryotların çoğu, bakteriler gibi, kendini eşleme yeteneğindeki tek bir hücreden oluşan tek hücreli organizmalardır. En basit ökaryotlar **mayalardır**. Mayalar, bakterilerden daha karmaşık, ancak hayvan ve bitki hücrelerinden çok daha küçük ve basittirler. Örneğin, yaygın olarak çalışılan bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nın çapı yaklaşık olarak 6 µm dir ve 12 milyon baz çiftlik bir DNA içerir (Şekil 1.9). Ancak, diğer tek hücreli ökaryotlar çok daha karmaşık hücrelerdir ve bazıları insan hücrelerindeki kadar DNA'ya sahiptirler (Tablo 1.2).

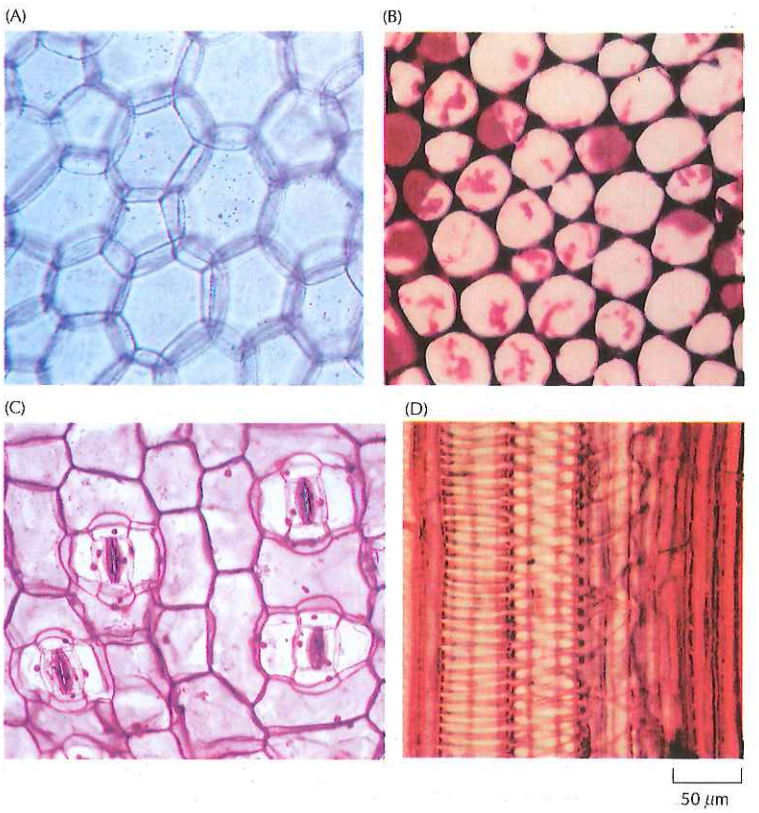
Bunlar, fotosentez, hareket ve diğer canlıları yakalayıp yemek gibi çeşitli işleri gerçekleştirmek üzere özelleşmiş organizmaları kapsar. Örneğin, *Amoeba proteus*, büyük ve karmaşık bir hücredir. Hacmi, *E.coli*'ninkinden 100 000 kez daha büyüktür ve hücre tam uzatılacak olursa boyu 1mm'yi aşabilir (Şekil 1.10). Amipler oldukça hareketli organizmalar olup, hareket etmek ve besin olarak bakteri ve mayalar gibi diğer organizmaları yutmak için, **psödopod (yalancı ayak)** denilen sitoplazmik uzantılarını kullanırlar. Diğer tek hücreli ökaryotlar (yeşil algler) kloroplast içerirler ve fotosentez yapabilme yeteneğindedirler.

Çok hücreli organizmalar, en az 1.7 milyar yıl önce tek hücreli ökaryotlardan evrimleştiler. Bazı tek hücreli ökaryotlar çok hücreli kümeler oluştururlar, bunlar, tek hücrelerden çok hücreli organizmalara evrimsel geçişi simgelemektedir. Örneğin, birçok alg hücresi (örn., *Volvox* adlı yeşil alg), günümüzdeki bitkilerin evrimsel öncüleri olduğu düşünülen çok hücreli kolonileri oluşturmak üzere bir araya gelirler (Şekil 1.11). Giderek artan hücre özelleşmeleri, koloni topluluğundan gerçek çok hücrelilere geçişi sağlamıştır. Hücre özelleşmesinin devamı ve bir organizmanın hücreleri arasında görev dağılımı, insan dahil günümüz hayvan ve bitkilerini oluşturan çeşitli hücre tiplerinde gözlenen karmaşıklığa ve farklılığa yol açmıştır.

Bitkiler, hayvanlara göre daha az hücre tipinden oluşurlar ancak, farklı tipteki her hücre, tüm organizma için gerekli özel bir görevi yerine getirmek üzere özelleşmiştir (Şekil 1.12). Bitki hücreleri üç ana doku sisteminde organize olmuştur: destek doku, dermal doku ve damar dokusu.

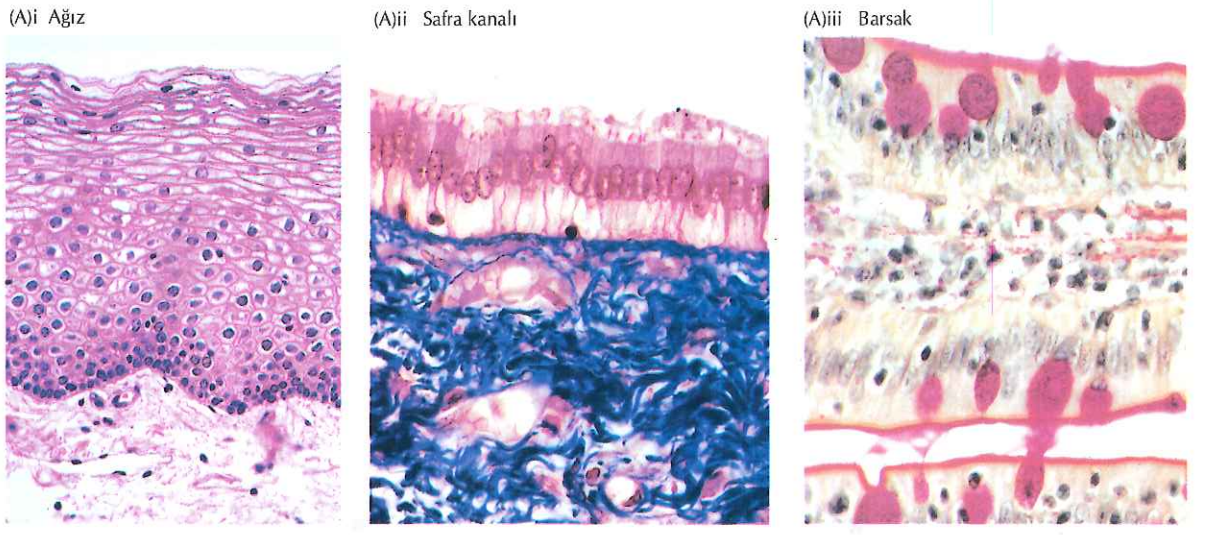


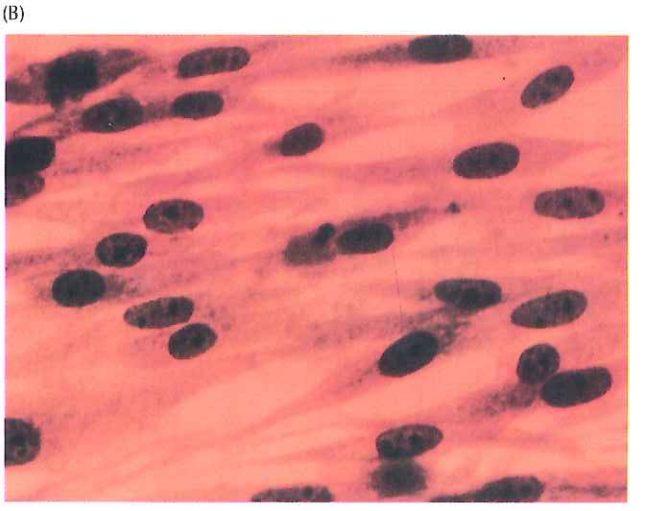
Şekil 1.11 Koloni halindeki yeşil algler
Volvox hücreleri, içerisinde jelatinimsi bir matris içine gömülü yüzlerce, hatta, binlerce hücre bulunan, şeffaf küre şeklinde koloniler oluşturur. (Cabisco/Visuals Unlimited.)

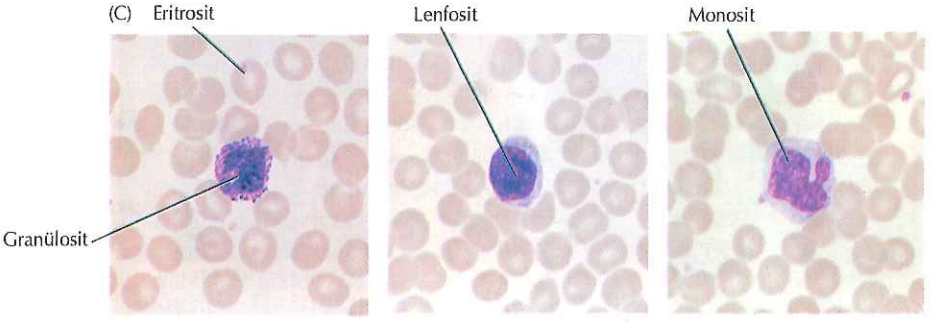


Şekil 1.12 Örnek bitki hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri
(A) Fotosentez ve diğer metabolik tepkimelerden sorumlu olan parankim hücreleri. (B) Kalınlaşmış hücre duvarına sahip, destek için özelleşmiş kollenkim hücreleri. (C) Yaprak yüzeyindeki epidermal hücreler. Küçük deliklerin (stomata) yanlarında bekçi hücreleri denilen özelleşmiş hücreler bulunur. (D) Damar elemanları ve trakeidler, ksilemin kanallarını oluşturmak üzere uç uca dizilen uzun hücrelerdir. (A, Jack M. Bastsack / Visuals Unlimited; B, A.J. Karpoff / Visuals Unlimited; C, Alfred Owczarzak/ Biological Photo Service; D, Biophoto Associates/ Science Source/Photo Researchers Inc.)

Destek doku, fotosentez dahil, bitkideki metabolik reaksiyonların çoğunu gerçekleştiren parenkim hücrelerini içerirler. Destek doku ayrıca, kalın hücre duvarları ile karakterize olan ve bitkiye yapısal destek sağlayan iki özel hücre tipini de kapsar (kollenkim hücreleri ve sklerenkim hücreleri). Deri doku bitkinin yüzeyini kaplar ve koruyucu bir kılıf oluşturan ve besinlerin emilimine izin veren epidermal







Şekil 1.13 Örnek hayvan hücresinin ışık mikroskobu görüntüleri
(A) Ağızda (kalın, çok katlı tabaka), safra kanalında ve barsakta bulunan epitel hücreler. (B) Fibroblastlar, uzun iğ şeklindeki görünüşleriyle karakterize bağ doku hücreleridir. (C) İnsan kanındaki, eritrositler, granülositler, lenfositler ve monositler. [(A)i ve (A)ii, G. W. Willis/ Biological Photo Service; (A)iii, Biophoto Associates/ Photo Researchers, Inc.; B, Don W. Fawcett/ Visuals Unlimited; C, G. W. Willis/ Biological Photo Service.]

hücrelerden oluşur. Nihayet, birkaç tip uzun hücre, besinlerin ve suyun bitki içerisinde iletimiyle görevli olan damar sistemini (ksilem ve floem) oluştururlar.

Hayvanlarda bulunan hücreler bitkilerinkilerden daha fazla farklılık gösterir. Örneğin; insan vücudu; epitel doku, bağ dokusu, kan, sinir dokusu ve kas olmak üzere beş ana dokunun bileşenleri olarak kabul edilen 200'den fazla farklı hücre tipinden oluşmuştur. (Şekil 1.13) **Epitel hücreler**, vücut yüzeyini saran ve iç organları kaplayan tabakaları oluşturur. Koruma (deri), emilim (örn., ince barsağı kaplayan hücreler) ve salgılama (örn., tükrük bezlerinin hücreleri) gibi farklı işlevleri gerçekleştirmek üzere özelleşmiş olan, bir çok farklı epitel hücre tipi vardır. Bağ dokuları, her biri farklı hücre tiplerinden oluşmuş (sırasıyla; osteoblastlar, kondrositler ve adipozitler), kemik, kıkırdak ve yağ (adipoz) dokusunu kapsar. Epitel tabakasının altında yer alan ve vücutta bulunan organlar ile dokular arasındaki boşlukları dolduran gevşek bağ dokusu, diğer bir hücre tipi olan **fibroblastlardan** oluşmuştur. Kan, oksijen taşınmasında (kırmızı kan hücreleri veya **eritrositler**), yangısal reaksiyonlarda (**granülositler**, **monositler** ve **makrofajlar**) ve bağışıklık yanıtında (**lenfositler**) görevli olan, bir kaç farklı tipte hücre içerir. Sinir dokusu, vücudun bir ucundan diğer ucuna sinyalleri iletmek üzere yüksek oranda özelleşmiş sinir hücrelerinden, **nöronlardan** oluşur. Göz ve kulaktaki hücreler gibi, çeşitli tipte duyu hücreleri, çevreden gelen sinyalleri almak üzere daha da özelleşmişlerdir. Son olarak, birçok farklı tip kas hücresi, güç ve hareketin oluşmasından sorumludur.

Hayvanların evrimi, açık bir şekilde, hücre düzeyinde önemli oranda çeşitlenme ve özelleşmeyi gerektirir. Tek bir döllenmiş yumurtadan başlayarak, bu denli karmaşık bir özelleşmiş hücre donanımının gelişmesini ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmanın anlaşılması, çağımızın hücre ve moleküler biyolojisinde karşılaşılan en önemli sorunlardandır.

Deneysel Model Olarak Hücreler

Günümüz hücrelerinin ortak bir atadan gelmiş olmaları, deneysel bilim olarak hücre ve moleküler biyoloji için önemli anlam taşır. Tüm hücrelerin temel özelliklerinin evrim süresince korunmuş olması nedeniyle, genellikle bir tip hücre ile yapılan deneylerden elde edilen temel prensipler diğer hücrelere de uygulanabilir. Öte yandan, günümüz hücrelerinin çeşitliliğinden dolayı, deneylerin çoğu bir hücre tipinde diğerine kıyasla daha başarılı olabilir. Çeşitli türde birçok hücre ve organizma, hücre ve moleküler biyolojinin çeşitli yönlerinin araştırılması amacıyla, yaygın olarak kullanılır. Bu hücreleri deneysel model olarak avantajlı yapan bazı özellikleri izleyen bölümde ele alınmıştır.

E.coli

Göreli sadelikleri nedeniyle prokaryotik hücreler (bakteriler), biyokimya ve moleküler biyolojinin belli başlı yönlerini çalışmak için ideal modellerdir. Bakterilerin en kapsamlı çalışılan türü, uzun zamandan beri moleküler genetiğin ana mekanizmasına yönelik yapılan araştırmalar için en çok tercih edilen organizma olan *E.coli*'dir. DNA replikasyonu, genetik kod, gen ekspresyonu ve protein sentezinin anlaşılması gibi, mevcut moleküler biyoloji kavramlarının çoğu bu sıradan bakterinin incelenmesiyle sağlanmıştır.

Şekil 1.14 Bakteri kolonileri
Agar içeren ortam yüzeyinde çoğalmış *E.coli* kolonilerinin fotoğrafı (A. M. Siegelman / Visuals Unlimited)

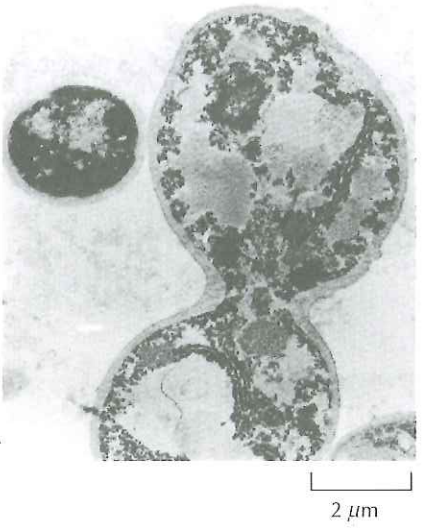
E.coli, laboratuvar ortamında üretilip çalışılmasının kolaylığı ve nispeten basit yapısı nedeniyle moleküler biyologlar için, özellikle çok kullanışlıdır. Örneğin; *E.coli*'nin genomu, yaklaşık olarak, 4.6 milyon baz çiftinden oluşur ve 4000 civarında gen içerir. İnsan genomu yaklaşık olarak bin kez daha büyüktür (aşağı yukarı 3 milyar baz çifti) ve 30 – 40,000 gen içerdiği düşünülmektedir (bkz. Tablo 1.2). *E. coli* genomunun küçük boyutu (dizini 1997'de tümüyle belirlenmiştir), genetik analizler için belirgin avantaj sağlar.

Moleküler genetik deneyler, iyi tanımlanmış laboratuvar koşullarında *E.coli*'nin hızlı çoğalması sayesinde daha kolaylaşmıştır. En uygun kültür koşullarında *E.coli*, her 20 dakikada bir bölünür. Dahası, tüm hücrelerin, başlangıçtaki tek bir hücrenin bölünmesiyle oluştuğu klonal *E. coli* populasyonu, agarlı yarı katı ortamda büyüyen bir koloni olarak kolaylıkla izole edilebilir (Şekil 1.14). Bir gecede 10^8 kadar yüksek sayıda hücre içeren bakteri kolonileri gelişebildiğinden, penisilin gibi antibiyotiklere dirençli, mutant *E. coli* varyantlarının seçilimi hızlı ve kolaydır. Bu gibi mutantların seçilim kolaylığı, Bölüm 3'de ele alınan, moleküler biyolojinin temel prensiplerini açıklayan deneylerin başarısı için önemlidir.

E. coli'nin en hızlı bölündüğü besin karışımları; glukoz, tuzlar ile, amino asitler, vitaminler ve nükleik asit öncülleri gibi çeşitli organik bileşikleri içerir. Bununla birlikte *E. coli*, sadece tuzlar, bir nitrojen kaynağı (amonyum gibi) ile bir karbon ve enerji kaynağından (glukoz gibi) oluşan, çok daha basit bir ortamlarda da çoğalabilir. Tüm amino asitlerini, nükleotidlerini ve diğer organik bileşiklerini sentezlemek zorunda oldukları için, bu gibi ortamlarda bakteriler biraz daha yavaş çoğalırlar (yaklaşık 40 dakika bölünme süresi). Basitleştirilmiş ortamda bu biyosentetik reaksiyonları gerçekleştirme yeteneği, *E. coli*'yi, söz konusu biyokimyasal yolların aydınlatılmasında oldukça kullanışlı bir hale getirmiştir. Bu nedenle, *E. coli*'nin hızlı çoğalması ve basit besinsel gereksinimleri, hem moleküler biyoloji hem de biyokimyada yapılan temel araştırmaları oldukça kolaylaştırmıştır.

Mayalar

Bakteriler, hücrenin korunmuş birçok özelliğinin çalışılması için çok değerli bir model olmasına karşın, ökaryotlara özgü yapı ve işlev konularının araştırılması için kullanılamayacakları açıktır. En basit ökaryotlar olan mayalar *E.coli*'ninkine benzer birçok deneysel avantaja sahiptir. Bu nedenle, ökaryot hücre biyolojisinin temel özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalar için çok önemli bir model sağlar.



Şekil 1.15 *Saccharomyces cerevisiae*'nın elektron mikroskop görüntüsü
(David Scharf / Peter Arnold, Inc.)

En sık çalışılan maya *Saccharomyces cerevisiae*'nın genomu 12 milyon baz çiftinden oluşur ve 6,000 civarında gen içerir. Mayanın genomu her ne kadar *E. coli*'ninkinden üç kat daha büyük ise de, insan gibi, daha karmaşık ökaryot genomlarından çok daha kullanışlıdır. Maya hücresi tüm basitliğine rağmen ökaryot hücrelerin tipik özelliklerini sergiler (Şekil 1.15): Nükleer zarla çevrili belirgin bir nükleusu vardır, genomik DNA'sı 16 doğrusal kromozom şeklinde düzenlenmiştir ve sitoplazmasında hücre iskeleti ve hücre içi organeller bulunur.

Mayalar laboratuvar ortamında kolaylıkla çoğaltılabilir ve *E. coli* ile başarısı kanıtlanmış moleküler genetik yaklaşımların bir çoğuyla çalışılabilir. Mayalar, bakteriler kadar hızlı çoğalmasalar da, her 2 saatte bir bölünürler ve tek bir hücreden koloni halinde çoğaltılabilirler. Sonuç olarak, mayalar, bakteri kullanılarak gerçekleştirilebilenlere benzer çeşitli genetik uygulamalarda kullanılabilirler.

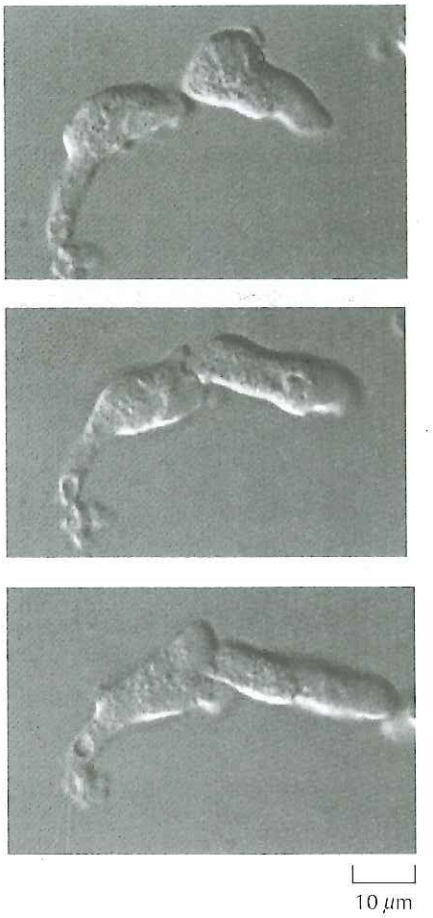
Bu özellikleri, maya hücrelerini, moleküler biyoloji açısından en geçerli ökaryotik hücre yapmıştır. İzleyen bölümlerde tartışılacağı gibi, maya mutantları; DNA replikasyonu, transkripsiyon, RNA işlenmesi, protein tasnifi ve hücre bölünmesinin regülasyonu dahil ökaryotlardaki bir çok temel işlevin anlaşılmasında yararlı olmuştur. Maya araştırmalarıyla açığa çıkan hücre yapı ve işlev kurallarının tüm ökaryot hücreler için geçerli olduğu gerçeği, moleküler hücre biyolojisinin birliğini açıkça ortaya koymuştur.

Dictyostelium discoideum

Dictyostelium discoideum, mayalar gibi, nispeten basit tek hücreli bir ökaryot olan hücresel sümüksü mantardır. *Dictyostelium* genomu *E.coli*'ninkinden yaklaşık on kat büyük ve maya genomundan daha karmaşıktır, ancak, yüksek ökaryotların genomuna kıyasla çok basittir. Üstelik, *Dictyostelium* laboratuvarda kolayca üretilebilir ve çeşitli genetik kullanımlar için uygundur.

Yiyeceğin bol olduğu koşullarda, *Dictyostelium* bakteri ve mayalarla beslenen tek-hücreli bir amip olarak yaşamını sürdürür. Çok hareketli bir hücredir ve bu özelliği *Dictyostelium*'u, hayvan hücresi hareketlerini oluşturan moleküler mekanizmaların incelenmesi için uygun bir model yapar (Şekil 1.16). Örneğin, *Dictyostelium*'un uygun mutantları elde edilerek, birkaç genin hücre hareketliliğindeki rolü aydınlatılmıştır.

Dictyostelium'un diğer bir ilginç özelliği de, tek hücrelerin çok hücreli yapılar şeklinde bir araya toplanma yetenekleridir. Yeterli besin kaynağının bulunmadığı durumda hücreler, her biri tek vücut halinde fonksiyon gören 100,000 kadar hücreden oluşan ve sümüklü böcek denilen solucanımsı yapılar oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu nedenle *Dictyostelium*, hücre sinyal iletimi ve hücre-hücre etkileşimlerini araştırmak için önemli bir model oluşturarak, tek hücreli ile çok hücreli organizmalar sınırında yer almaktadır.

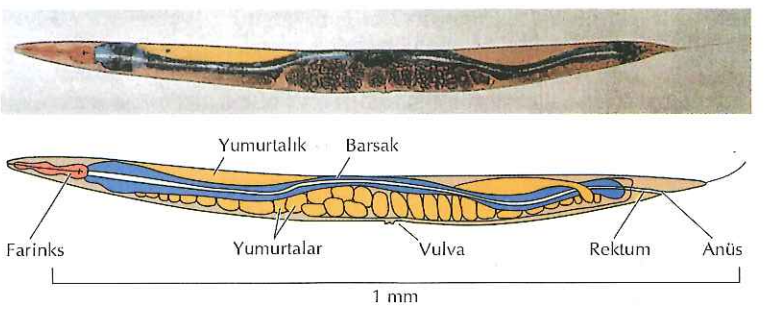


Şekil 1.16 Dictyostelium discoideum
Fotoğraflar, iki amibin 40 saniyelik süreçteki hareketini gösteriyor. (David Knecht'in katkıları, University of Connecticut.)

Caenorhabditis elegans

Saccharomyces ve *Dictyostelium* gibi tek hücreli ökaryotlar, ökaryot hücrelerin araştırılmasında önemli modellerdir, ancak, çok hücreli canlıların gelişimini anlayabilmek için, hayvanlar ve bitkiler gibi daha karmaşık canlıların incelenmesi gerekir. Bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*, hayvan gelişiminin ve hücre farklılaşmasının araştırılmasında en yaygın kullanılan modellerden biri olmasını sağlayan önemli özelliklere sahiptir (Şekil 1.17).

C. elegans genomu (yaklaşık 100 milyon baz çifti) tek hücreli ökaryotlarınkinden daha büyük olmakla beraber, bir çok hayvan genomuna kıyasla daha basit ve ulaşılabilirdir. Dizi analizi tamamlanmış olan *C. elegans* genomunun yaklaşık 19,000 gen içerdiği belirlenmiştir ki bu, mayanın gen sayısının üç katı ve insan genlerinin



Şekil 1.17 *Caenorhabditis elegans*
(J.E. Sulston ve H.R. Horvitz, 1977. Dev. Biol. 56: 110'dan.)

Şekil 1.18 ***Drosophila melanogaster***
(Darwin Dale / Photo Researchers, Inc.)

sayısının yarısı kadardır. Biyolojik olarak, *C. elegans* nispeten basit yapılı bir, çok hücreli organizmadır: Erişkin kurtlar sadece 959 somatik hücre ile, 1000 ila 2000 germ hücresinden oluşmuştur. Ayrıca, *C. elegans* laboratuvarda kolayca üretilebilir ve genetik işlemlerde kullanılabilirler.

C. elegans'ın sadeliği sayesinde, gelişim sürecini mikroskop izlemiyle detaylı olarak incelemek mümkündür. Bu analizler, erişkin kurdun tüm hücrelerinin embriyonik kökeninin ve soyunun başarıyla izlenmesini sağladı. Genetik çalışmalarla da, gelişimsel hatalardan sorumlu mutasyonların bir çoğu tanımlandı, böylece, nematod gelişimini ve farklılaşmasını denetleyen önemli genlerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleşti. En önemlisi, benzer genlerin kompleks hayvanlarda (insan dahil) da işlevsel olduklarının bulunuşu idi ki bu, *C. elegans*'ın hayvan gelişiminin incelenmesi için önemli bir örnek olmasına yol açtı.

Drosophila melanogaster

C. elegans gibi, meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Şekil 1.18) de gelişimsel biyolojide çok önemli bir model oluşturmuştur. *Drosophila melanogaster* genomu sadece 14,000 kadar gen içermesine karşın, *Drosophila* genomunun büyüklüğü *C. elegans*'ınki ile benzerdir. Bunun da ötesinde, *Drosophila* laboratuvarda kolayca bakılıp çoğaltılabilir ve üreme döngüsünün kısalığı (iki hafta kadar) genetik çalışmalar için kullanışlı bir canlı olmasını sağlar. Genlerle kromozomlar arasındaki ilişki gibi bir çok temel genetik kavram, yirminci yüzyılın başlarında *Drosophila* ile yapılan çalışmlardan doğmuştur (bkz. Bölüm 3).

Drosophila ile yapılan kapsamlı genetik analizler, gelişim ve farklılaşmayı denetleyen bir çok geni ortaya çıkardı ve güncel moleküler biyoloji yöntemleri bu genlerin işlevlerinin detaylı olarak incelenmesine olanak sağladı. Sonuç olarak, *Drosophila* araştırmaları, özellikle karmaşık çok hücreli organizmaların vücut planının oluşumu açısından, hayvan gelişimini yöneten moleküler mekanizmaların anlaşılmasında olağanüstü ilerleme sağladı. *C. elegans*'la olduğu gibi, omurgalılarda benzer genlerin ve işlevlerin bulunuşu, çağdaş gelişimsel biyolojide *Drosophila*'nın en önemli deneysel model olarak kullanılmasını geçerli kıldı.

Şekil 1.19 ***Arabidopsis thaliana***
(Jeremy Burgess / Photo Researchers, Inc.)

Arabidopsis thaliana

Bitki moleküler biyoloji ve gelişiminin araştırılması, entellektüel ilgi kadar, hatırı sayılır ekonomik öneme sahip, aktif ve büyüyen bir alandır. Bitki genomları hayvan genomlarına kıyasla daha karmaşık bir alan kapladığından (bkz. Tablo 1.2), bitki gelişimi çalışmaları için seçilecek örnek, *C. elegans* ve *Drosophila*'nın bazı avantajlı özelliklerine sahip, nispeten basit bir canlı olmalıydı. Küçük, çiçekli bir bitki olan ***Arabidopsis thaliana*** (Şekil 1.19) bu kriterleri karşıladığından, bitki moleküler biyolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir örnek olmuştur.

Arabidopsis, yaklaşık 15,000 farklı gen içeren 120 milyon baz çiftlik genomuyla dikkate değer- *C. elegans* ve *Drosophila*'nınkine benzer bir komplekslik. Ayrıca, ***Arabidopsis***'in laboratuvarda üretimi nisbeten kolaydır ve bu bitkinin moleküler genetik kullanım yöntemleri geliştirilmiştir. Bu araştırmalar, bitki gelişiminin çeşitli yönleriyle ilgili genlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu genlerin incelenmesi, bitki ve hayvan gelişimini denetleyen mekanizmalar arasında bir çok benzerlikle birlikte çarpıcı farklılıklara da işaret eder.

Omurgalılar

En kompleks hayvanlar, insanları ve diğer memelileri de kapsayan omurgalılardır. İnsan genomu yaklaşık olarak 3 milyar baz çiftidir- *C. elegans, Drosophila* ya da *Arabidopsis*'inkinden 30 kat daha büyük- ve 30-40,000 gen kapsar. Dahası, insan vücudu 200'den fazla, farklı türdeki özelleşmiş hücre tipinden oluşur. Bu karmaşıklık, hücre ve moleküler biyoloji bakımından omurgalılarla çalışılmasını güçleştirir, ancak, her şeye rağmen, biyolojik bilimlerde ilginin çoğu insan organizmasını anlama arzusundan kaynaklanmaktadır. Üstelik, acil pratik öneme sahip bir çok sorunun yanıtının (örn., tıpta) direkt olarak insan (ya da çok yakın canlı) hücre tiplerinden elde edilmesi gerekir.

İnsan ve diğer memeli hücrelerinin incelenmesine yönelik önemli bir yaklaşım, izole hücreleri, kontrollü laboratuvar koşullarında manipüle edilebilecekleri kültürlerde üretmektir. Kültür hücrelerinin kullanılımı; DNA replikasyonu, gen ekspresyonu, protein sentezi ve işlenmesi ve hücre bölünmesi mekanizmalarını aydınlatmış olan deneyler gibi, memeli hücre biyolojisinin birçok yönünün araştırılmasına olanak sağlamıştır. Dahası, kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda hücrelerin kültüre edilebilmesi, organizmada hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden sinyal iletim mekanizmalarının araştırılmasına olanak sağlamıştır.

Yüksek düzeyde farklılaşmış bazı hücre tiplerinin özgün nitelikleri, hücre biyolojisinin belirli alanlarının araştırılması için önemli birer örnek olmalarını sağlar. Örneğin, kas hücreleri kasılmak, kuvvet ve hareket üretmek üzere oldukça özelleşmişlerdir. Bu özgünlükleri nedeniyle kas hücreleri, hücre hareketinin moleküler düzeyde incelenmesi için çok önemli bir modeldir. Diğer bir örnek, elektrokimyasal sinyalleri uzun mesafeler boyunca iletmek için özelleşmiş olan sinir hücreleridir (nöronlar). İnsanlarda, sinir hücresi aksonlarının uzunlukları bir metreden fazla olabilir ve mürekkepbalığı gibi bazı omurgasızlar, çapları 1mm'ye varan aksonları olan dev nöronlara sahiptir. Yüksek oranda özelleşmiş yapılarından ve işlevlerinden dolayı, bu dev nöronlar, plazma zarı boyunca iyon taşınımı ve sitoplazmik organellerin taşınımında hücre iskeletinin rolü üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan önemli modellerdir.

Bir kurbağa türü olan ***Xenopus laevis***, omurgalı gelişiminin erken dönemlerinin çalışılması için önemli bir modeldir. *Xenopus* yumurtaları, 1mm'ye varan çaplarıyla, olağanüstü büyüklükte hücrelerdir (Şekil 1.20). Bu yumurtalar anne vücudu dışında geliştiği için, yumurtadan iribaşa (tadpole) kadar tüm gelişim süreci laboratuvar ortamında kolaylıkla incelenebilir. Ayrıca, *Xenopus* yumurtalarının bol miktarda elde edilebilmesi biyokimyasal incelemeleri kolaylaştırır. Bu teknik avantajları nedeniyle, *Xenopus*, gelişimsel biyoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmış, gelişim, farklılaşma ve embriyonik hücre bölünmesini kontrol eden moleküler mekanizmaların kavranmasını sağlamıştır.

Zebra balığı (Şekil 1.21), omurgalı gelişiminin genetik incelemeleri için bazı avantajlara sahiptir. Bu küçük balıkların laboratuvarda bakımı kolaydır ve hızlı çoğalırlar. Buna ek olarak, embriyolar anne vücudunun dışında gelişirler ve şeffaftırlar, bu nedenle gelişimin erken evreleri kolayca gözlenebilir. Zebra balığı'nın

Şekil 1.20 Kurbağa Xenopus laevis'in yumurtaları
(Michael Danilchik ve Kimberly Ray'in katkısı.)

Şekil 1.21 Zebra balığı
(A) 24 saatlik bir embriyo. (B) Erişkin bir balık. (A, Charles Kimmel, University of Oregon katkısı; B, S. Kondo'nun katkısı.)

gelişimini etkileyen mutasyonların izolasyonunu kolaylaştırmak için etkili metotlar geliştirilmiştir ve şu anda bu mutasyonlardan birkaç bini tanımlanmıştır. Çalışılması kolay bir omurgalı olması nedeniyle zebra balığının, insanlar ile *C.elegans* ve *Drosophila* gibi daha basit omurgasız sistemler arasındaki boşluğu kapatabileceği umulmaktadır.

Memeliler arasında, fare, genetik analizler için en uygun olan canlıdır ve yakın zamanda fare genom dizininin tamamlanması bunu kolaylaştıracaktır. Fare genetiği araştırmalarında teknik zorlukları (örneğin, maya veya *Drosophila* genetiğiyle kıyaslandığında) yenmek güç olmasına karşın, fare gelişimini etkileyen birçok mutasyon tanımlanmıştır. En önemlisi, moleküler biyolojideki son gelişmeler, özgül mutant genlerin fare germ hattına yerleştirildiği ve böylece gelişim üzerindeki etkilerinin veya diğer hücresel işlevlerin tüm hayvan bağlamında çalışılabildiği, transgenik farelerin üretimine olanak sağlamıştır. İnsan gelişimi için farenin uygun bir model olduğu, sadece insan ve fare genomlarının benzerliğiyle değil, aynı zamanda homolog genlerdeki mutasyonların her iki türde de benzer gelişim bozukluklar ile sonuçlanmasıyla da gösterilmiştir; piebaldism çarpıcı bir örnektir (Şekil 1.22).

Hücre Biyolojisinin Gereçleri

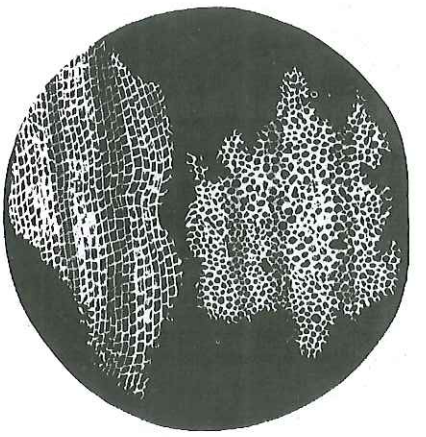
Tüm deneysel bilimlerde olduğu gibi, hücre biyolojisi araştırmaları, hücre yapısını ve işlevini incelemek için kullanılabilecek laboratuvar yöntemlerine gereksinir. Hücreleri anlamaya yönelik bir çok önemli

Şekil 1.22 İnsan gelişimi için model olarak fare
Bir çocuk ve bir fare, embriyonik gelişim sürecinde melanositlerin (derinin renklenmesinden sorumlu hücreler) normal göçü için gerekli olan gendeki mutasyonların bir sonucu olarak, benzer pigmentasyon bozuklukları (piebaldism) gösterirler. (R.A.Fleichman, Markey Cancer Center, University of Kentucky.)

gelişme, direkt olarak, yeni araştırma kulvarı açan modern yöntemlerin gelişimini izlemiştir. Hücre biyologlarının ellerindeki deney araçlarını değerlendirmeleri, bu çok hızlı gelişen bilim alanının hem güncel konumunun hem de gelecek hedeflerinin anlaşılması açısından önemlidir. Bazı önemli genel hücre biyolojisi yöntemleri, izleyen bölümlerde tanıtılmıştır. Biyokimya ve moleküler biyoloji yöntemlerini de içeren diğer deneysel yaklaşımlar, daha sonraki bölümlerde tartışılacaktır.

Işık Mikroskopisi

Hücrelerin çoğu çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olduklarından, hücre çalışmaları ağırlıklı olarak mikroskop kullanımı gerektirir. Gerçekten, hücrelerin keşfi mikroskobun geliştirilmesinden doğmuştur: Robert Hook 1665'de basit bir ışık mikroskobu ile, bir şişe mantarı parçasını gözlemleyerek "hücre" sözcüğünü ilk kez kullanmıştır (Şekil 1.23). Antony van Leeuwenhoek 1670'lerde, objeleri gerçek boyutlarının 300 katı kadar büyüten mikroskop kullanarak; sperm, kırmızı kan hücresi ve bakteriler gibi farklı türde çeşitli hücreleri gözleyebildi. Hücre teorisinin 1838'de Matthias Schleiden ve Theodor Schwann tarafından ortaya atılması, çağdaş hücre biyolojisinin doğuşu olarak kabul edilebilir. Schleiden tarafından bitki dokularının ve Schwann tarafından hayvan dokularının mikroskobik gözlemleri aynı sonuca ulaştırdı: Tüm canlılar hücrelerden oluşur. Bu gelişmelerin hemen ardından, hücrelerin *de novo* oluşmadıkları, ancak daha önceden var olan hücrelerin bölünmesiyle ortaya çıktıkları anlaşıldı. Böylece, gözlemler ışık mikroskobuyla yapıldığı için, hücre, bütün canlı organizmaların temel birimi şeklindeki yaygın tanımını elde etti.



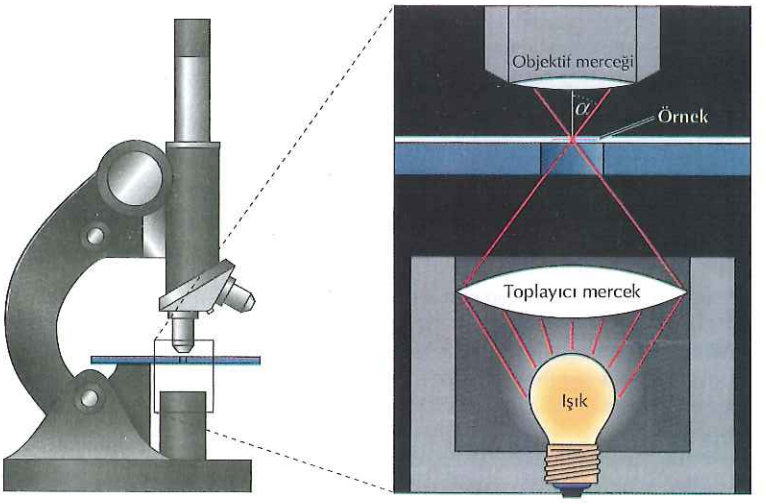
Şekil 1.23 Şişe mantarının hücresel yapısı
Robert Hooke'un, ışık mikroskobu ile incelenen ince bir şişe mantarı kesidini gösteren çiziminin röprodüksiyonu. Hooke'un gözlemlediği "hücreler" aslında, yalnızca, çok önce ölmüş olan hücrelerin duvar kalıntılarıdır.

Hücre yapısının gittikçe daha ayrıntılı olarak görüntülenmesine olanak veren teknik gelişmelerle, ışık mikroskobu hala biyologların temel araçlarından biridir. Günümüz ışık mikroskopları, objeleri yaklaşık bin kez büyütme kapasitesine sahiptir. Çoğu 1 ila 100 μm çapında olan hücreler ışık mikroskobu ile gözlenebildiği gibi, nükleus, kloroplastlar ve mitokondriler gibi, büyükçe hücre içi organeller de izlenebilir. Bununla birlikte, ışık mikroskopları hücre yapısının çok ince ayrıntılarını göstermek için yeterince güçlü değildir, bunun için **rezolüsyon** - bir mikroskobun, küçük mesafelerle ayrılmış objeleri ayırt etme kapasitesi - büyütmeden bile daha önemlidir. Görüntüler istenildiği kadar büyütülebilir (örneğin, büyük bir perdeye yansıtılarak), ancak, bu şekilde büyütme, gözlenebilen detay düzeyini artırmaz.

Bir ışık mikroskobunun rezolüsyon sınırı yaklaşık olarak 0.2 μm'dir; birbirine bu mesafeden daha yakın olan iki cisim birbirinden ayırt edilemez, tek bir cisim gibi görünür. Işık mikroskopisinin bu kuramsal sınırlılığını, aşağıdaki eşitlikte görülen iki faktör belirler- görünen ışığın dalga boyu (λ) ve mikroskop merceğinin ışık toplama gücü (nümerik açıklık, *NA*):

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}}$$

Görünen ışığın dalga boyu 0.4 ila 0.7 μm dir, bu nedenle λ'nın değeri, ışık mikroskobu için 0.5 μm civarında sabittir. Nümerik açıklık, örnekten geçtikten sonra, mikroskop merceğine giren ışık



Şekil 1.24 Nümerik açıklık
Işık, toplayıcı mercekle örnek üzerine odaklanır ve daha sonra mikroskobun objektif merceğiyle toplanır. Nümerik açıklık, objektif merceğine gelen ışık konisinin açısıyla (α) ve mercekle örnek arasındaki ortamın (genellikle hava veya yağ) kırma indeksiyle belirlenir.

konisinin büyüklüğü olarak düşünülebilir (Şekil 1.24). Işığın, örnek ile mercek arasında yol aldığı ortamın kırma indeksi η olarak alındığında;

$$NA = \eta \sin \alpha$$

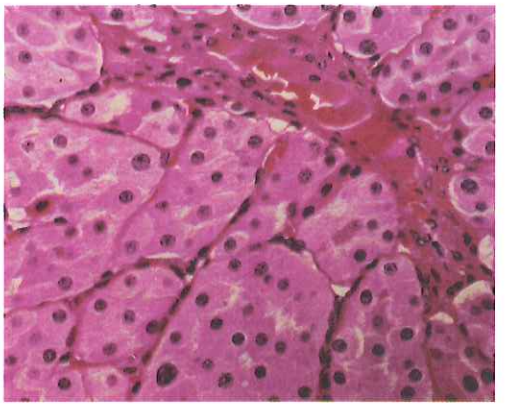
eşitliğiyle belirtilir. Hava için η değeri 1.0 dır, fakat, örneği bir damla yağ üzerinden incelemek için yağ-immersiyon lensi kullanılarak bu değer yaklaşık 1.4 le maksimuma çıkarılabilir. Alfa açısı, lens tarafından toplanan ışık konisinin genişliğinin yarısına denktir. Maksimum α değeri 90°'dir, bu durumda sin α=1 ve nümerik açıklığın en yüksek olası değeri ise 1.4 dür.

Işık mikroskobunun kuramsal rezolüsyon sınırı, aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\text{Rezolüsyon} = \frac{0.61 \times 0,5}{1.4} = 0.22\ \mu m$$

Bu rezolüsyon düzeyine ulaşabilen mikroskoplar, 19. yüzyılın sonlarında yapılmıştı; ışık mikroskoplarında bu yönden daha fazla gelişme beklenemez.

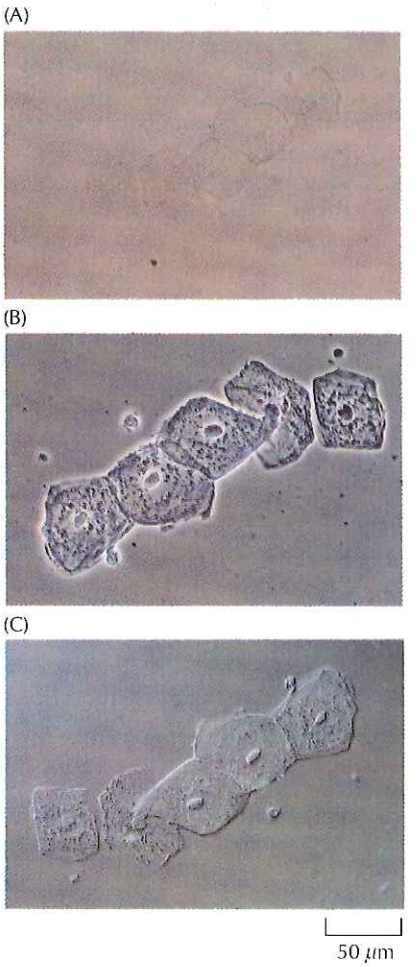
Hücre yapısının çeşitli yönleriyle incelenmesinde, birkaç farklı tip ışık mikroskobu rutin olarak kullanılır. En basiti, ışığın direkt olarak hücreden geçtiği ve hücrenin farklı bölgelerini ayırt edebilme kapasitesinin, görünen ışığın hücre bileşenleri tarafından soğurulmasından kaynaklanan kontrasta bağlı olduğu, **aydınlık alan mikroskopisidir**. Çoğu zaman, hücreler, farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kontrast farklılıkları oluşturmak üzere proteinlerle ya da nükleik asitlerle tepkime veren boyalarla boyanırlar. Boyama öncesinde, örnekler, yapılarının sağlamlaştırılması ve korunması için genellikle sabitleyicilerle (alkol, asetik asit veya formaldehit gibi) muamele edilirler. Sabitlenmiş ve boyanmış dokuların aydınlık-alan mikroskopisi ile incelenmesi, histoloji laboratuvarlarında doku analizi için standard bir yaklaşımdır (Şekil 1.25). Bu tarz boyama işlemleri hücreleri öldürdüğünden, canlı hücre gözlenmesini gerektiren birçok araştırma için uygun değildir.



Şekil 1.25 Boyalı dokunun aydınlık-alan mikroskop görüntüsü
Selim böbrek tümöründen bir kesit. (G. W. Willis / Biological Photo Service.)

Boyama yapılmadığı zaman, ışığın doğrudan dokudan geçmesi hücrenin çoğu bölümlerini ayırt edebilecek kontrastı

Şekil 1.26 Canlı hücrelerin mikroskopik gözlemi
İnsan yanak hücrelerinin (A) aydınlık–alan, (B) faz–kontrast ve (C) diferansiyel interferans – kontrast mikroskopisi ile elde edilen görüntüleri. (Mort Abramowitz, Olympus America, Inc.)



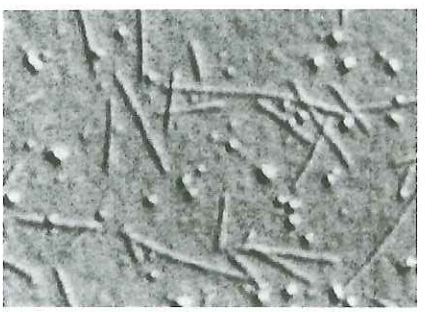
sağlamaz ve bu durum, aydınlık-alan mikroskopisinin kullanılabilirliğini sınırlar. Yine de, hücrenin farklı yoğunluklu bölgelerini geçen ışık dalgaları arasındaki kontrastı artıran, farklı optik düzenekli ışık mikroskopları kullanılabilir.

Canlı hücreleri görüntülemek için çok yaygın iki yöntem, **faz-kontrast mikroskopisi** ve **diferansiyel interferens-kontrast mikroskopisidir** (Şekil 1.26). Her iki mikroskopide de, hücrenin farklı bölgeleri arasındaki yoğunluk veya kalınlık farklılıklarını, sonuçtaki görüntüde kontrast farklılıklarına dönüştüren optik sistemler kullanılır. Aydınlık-alan mikroskopisinde, saydam yapılar (nukleus gibi) ışığı çok az soğurduklarından, düşük kontrast verirler. Ancak, ışık bu yapılardan geçerken yavaşlar ve çevresindeki sitoplazmadan geçen ışığa kıyasla faz değişikliği olur. Faz-kontrast ve diferansiyel interferans-kontrast mikroskopları, bu faz farklılaşmalarını kontrast farklılaşmalarına çevirerek, canlı, boyanmamış hücrelerin daha gelişmiş görüntülerinin elde edilmesini sağlar.

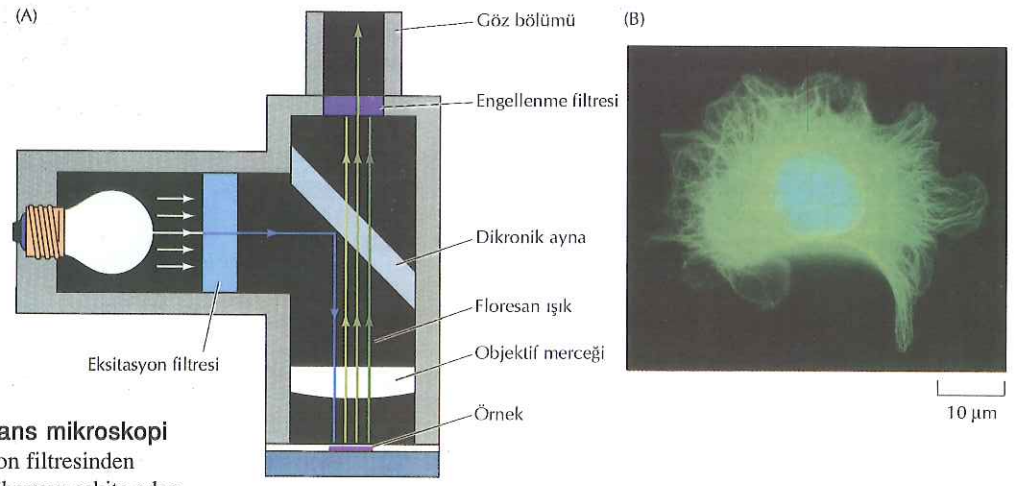
Işık mikroskobunun gücü, video kameralar ile görüntü analizi ve işlenmesi için bilgisayarların kullanılması ile önemli ölçüde artırılmıştır. Bu gibi elektronik görüntü-işleme sistemleri, ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastlığını artırarak, başka türlü saptanamayacak olan küçük objelerin görülebilmesine olanak sağlar. Örneğin; **video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferans-kontrast mikroskobu**, organellerin, yalnızca 0.025 μm çapında bir hücre iskeleti proteini olan mikrotübüller boyunca hareketlerinin görüntülenmesine olanak sağlamıştır (Şekil 1.27). Ancak, bu güç artışı, ışık mikroskobunun yaklaşık 0.2 μm olan teorik rezolüsyon sınırının üstesinden gelemez. Bu nedenle, video ile güçlendirme, her ne kadar, mikrotübüllerin görülebilmesini sağlamışsa da, mikrotübüller 0.2 μm çapında ve bulanık olarak görünür ve tek bir mikrotübül, yakınındaki yapılar arasında ayırt edilemez.

Belirli molekülleri hücre içinde görüntüleme amaçlı işaretleme yöntemleri sayesinde, ışık mikroskopisi moleküler analiz düzeyine ulaştırılmıştır. Spesifik genler veya RNA transkriptleri, komplementer dizili nükleik asit probları ile hibridizasyon yoluyla, proteinler de uygun antikorlar kullanılarak saptanabilir (bkz. Bölüm 3). Nükleik asit problar ve antikorlar, ışık mikroskobuyla görüntülenebilmeleri ve molekülün hücrenin içerisindeki yerinin belirlenebilmesi için, çeşitli takılarla işaretlenebilirler.

Floresans mikroskopisi, moleküllerin hücre içerisindeki dağılımını incelemek için, yaygın olarak kullanılan, oldukça duyarlı bir yöntemdir (Şekil 1.28). Canlı veya sabitlenmiş hücrelerin içindeki ilgilenilen molekülü işaretlemek için bir floresan boya kullanılır. Floresan boya, ışığı, bir dalga boyundan absorblayıp, ikinci bir dalga



Şekil 1.27 Video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferans-kontrast mikroskobu
Elektronik görüntü işleme mikrotübüllerin tek tek görülmesini sağlar. (E.D. Salmon'un katkısı, North Carolina Üniversitesi, Chapel Hill.)

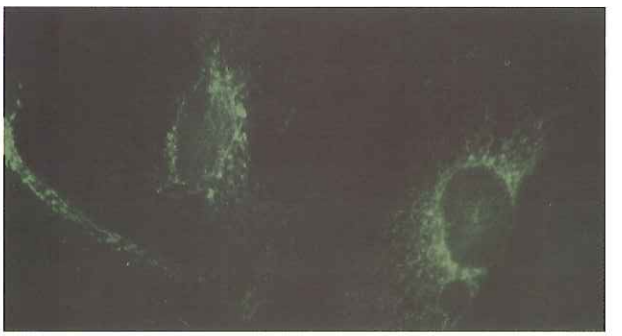


Şekil 1.28 Floresans mikroskopi
(A) Işık bir eksitasyon filtresinden geçirilerek, floresan boyayı eskite eden dalga boyundaki ışık (örn., mavi) seçilir. Dikronik bir ayna eksitasyon ışığını incelenecek örneğin üzerine yansıtır. Örneğin yaydığı floresan ışık (örn., yeşil) dikronik aynadan ve boyanın yaydığı dalga boyundaki ışığı seçecek olan ikinci filtreden (engel filtresi) geçer. (B) DNA'sı mavi, sitoplazmadaki mikrotübülleri yeşil boyanmış bir kertenkele akciğer hücresinin floresans mikroskop görüntüsü. (Conly S.Rieder /Biological Photo Service.)

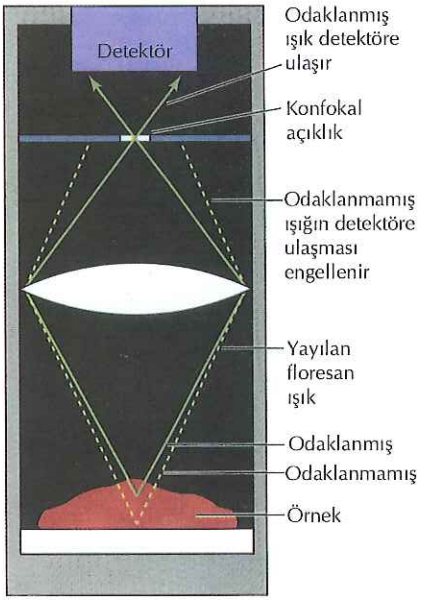
boyunda gönderen bir moleküldür. Bu floresans, incelenecek örneği, floresan boyayı eksite eden bir dalga boyunda ışınla ışınlayıp, boyanın gönderdiği ışığın özgün dalga boyunu yakalayabilen filtreler kullanılarak saptanır. Floresans mikroskopisi hücreler içerisinde çeşitli moleküllerin araştırılması amacıyla kullanılabilir. Sık uygulamalardan biri, özgül bir proteini hedefleyen antikorları floresan boyalarla işaretleyerek, proteinin hücre içi dağılımının saptanabilmesidir.

Floresans mikroskopisinde son zamanlardaki önemli bir gelişme, canlı hücrelerin içerisinde proteinleri görüntülemek için, denizanası **yeşil floresan proteini (GFP)'nin** kullanılmasıdır. GFP, standard rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak, ilgi duyulan herhangi bir proteinle birleştirilebilir ve GFP-eklentili protein hücreye verilerek, proteinlerin antikorla belirlenmesinde gerektiği gibi hücreleri sabitleyip boyamaya gerek olmadan, floresans mikroskopisi ile saptanabilir. Çok yönlü kullanılabilirliği nedeniyle, hücre biyolojisinde GFP kullanımı son derece yaygınlaşmıştır ve geniş çeşitlilikteki proteinlerin canlı hücreler içerisindeki hareketlerinin ve yerleşimlerinin izlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Şekil 1.29).

Konfokal mikroskopisi, yüksek kontrastlı ve ayrıntılı görüntüler elde etmek amacıyla, floresans mikroskopisini elektronik görüntü analizleri ile kombine eder. Genellikle bir lazer ile sağlanan küçük bir ışık noktası, incelenecek örnek üzerine, belirli derinlikte odaklanır. Yayılan floresan ışık, video kamera gibi bir detektör vasıtasıyla toplanır. Ancak, yayılan ışık detektöre ulaşmadan önce, tam olarak, örneğin seçilen derinliğinden gelen ışığın odaklandığı noktaya



Şekil 1.29 GFP ile işaretlenmiş bir proteinin floresans mikroskopisi
GFP ile birleştirilen bir mitokondri proteini, kültürdeki insan hücrelerine sokularak, floresans mikroskopisi ile görüntülendi. (BD Biosciences Clontech'in katkısı.)



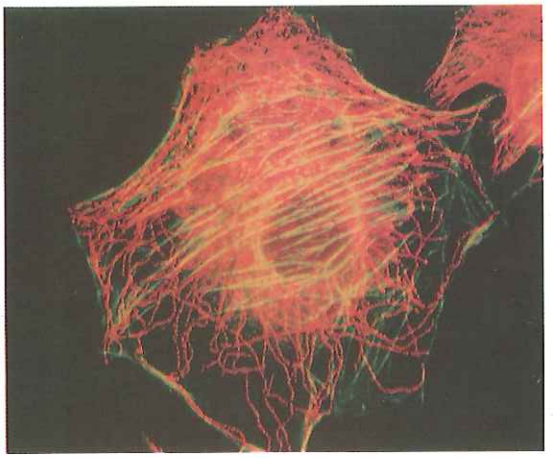
Şekil 1.30 Konfokal mikroskopi
İğne ucu genişliğinde bir ışık örnek üzerine belirli bir derinliğe odaklanır ve geri gelen floresan ışık bir detektörle toplanır. Örnekten yayılan ışık detektöre ulaşmadan önce, örneğin seçilen derinliğinden gelen ışığın odaklandığı noktaya yerleştirilen bir konfokal açıklıktan geçmesi gerekir. Sonuç olarak, sadece, örnekte seçilen derinlikten yayılan odaklanmış ışık saptanabilir.

yerleştirilen bir iğne deliği açıklığından (konfokal açıklığı) geçmesi gerekir (Şekil 1.30). Sonuç olarak, sadece odaklanılan düzlemden gönderilen ışık detektöre ulaşabilir. İncelenen örneğin baştan sona taranması ile, odaklanan düzlemin, standard floresans mikroskopisi ile elde edilenden çok daha keskin bir iki-boyutlu görüntüsü elde edilir (Şekil 1.31). Bunun da ötesinde, örneğin üç-boyutlu bir görüntüsünü kurgulamak için, farklı derinliklerde elde edilen bir dizi görüntüden yararlanılabilir.

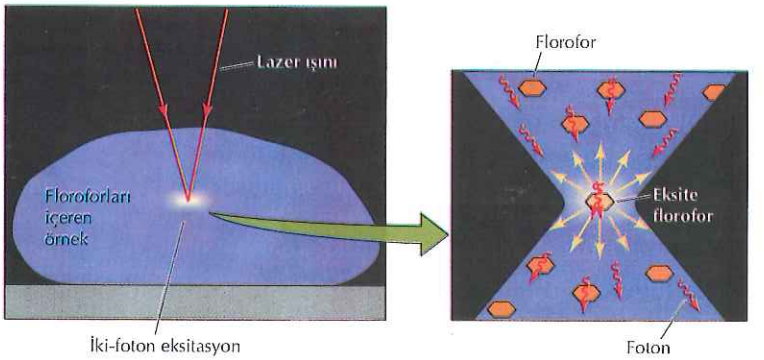
Multi-foton eksitasyon mikroskopisi, canlı hücrelerin incelenmesinde konfokal mikroskopiye alternatiftir. İncelenecek örnek, floresan boyanın, eksitasyonu için aynı anda iki veya daha çok foton soğurmasına uygun bir dalga boyunda ışıkla aydınlatılır (Şekil 1.32). İki fotonun aynı anda floresan boyayı uyarma olasılığı, sadece, örneğin içerisine giren lazer ışınının odaklandığı noktada anlamlıdır, böylece floresans yalnızca giren ışığın odaklanmış olduğu düzlemden yayılır. Bu çok iyi sınırlanan eksitasyon sayesinde, yayılan ışığın konfokal mikroskopisindeki gibi bir iğne deliği açıklığından geçirilmesine gerek olmadan, otomatik olarak üç-boyutlu çözünürlük elde edilir.

Elektron Mikroskopisi

Işık mikroskobunun çözünürlüğünün sınırlı oluşu, hücre yapısının daha ayrıntılı analizi için, 1930'larda geliştirilen ve biyolojik örnekler üzerinde ilk kez Albert Claude, Keith Porter ve George Palade tarafından 1940'larda ve 1950'lerde kullanılan elektron mikroskobu gibi, daha güçlü mikroskobik yöntemlerin kullanımını gerektirmiştir. Elektronların dalga boyu ışığınkinden daha kısa olduğu için, elektron mikroskobu ışık mikroskobuna göre çok daha yüksek çözünürlüğe ulaşabilir. Bir elektron mikroskobunda elektronların dalga boyu 0.004 nm kadar kısa olabilir, ki bu, görünen ışığın dalga boyundan yaklaşık



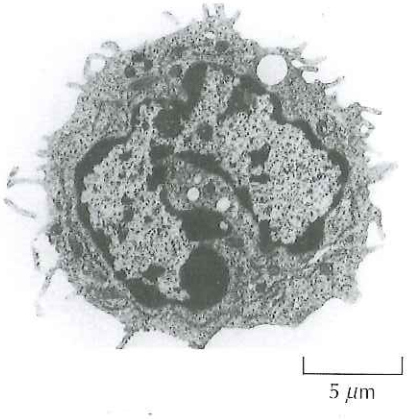
Şekil 1.31 İnsan hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü
Mikrotübüller ve aktin filamanları, sırasıyla, kırmızı ve yeşil floresan boya ile boyalı. (K. G. Murti / Visuals Unlimited.)



Şekil 1.32 İki-foton eksitasyon mikroskopisi
Floresan boyayı uyarmak için iki fotonun eşzamanlı absorbsiyonu gerekir. Bu sadece, gelen ışığın örnek içerisinde odaklandığı noktada meydana gelir, böylece, floresan ışık sadece örneğin belirlenen derinliğinden yayılır.

100,000 kez daha kısadır. Teorik olarak bu dalga boyunun 0.002 nm çözünürlük sağlaması gerekir, ancak, çözünürlük sadece dalga boyuyla değil aynı zamanda mikroskop merceğinin nümerik açıklığıyla da belirlendiğinden, pratikte bu çözünürlük elde edilemez. Elektromanyetik merceklerin doğası, açıklık açılarını yaklaşık 0.5 derece ile sınırladığı ve bu da sadece 0.01 kadar bir nümerik açıklığa denk geldiği için, elektron mikroskopisinde nümerik açıklık sınırlayıcı faktördür. Yani, optimum koşullarda, elektron mikroskobunun çözme gücü 0.2 nm kadardır. Bunun da ötesinde, biyolojik örneklerle elde edilebilen çözünürlük, doğal kontrast eksiklikleri nedeniyle daha da sınırlıdır. Sonuç olarak, biyolojik örnekler için elektron mikroskobunun pratikteki limiti 1 ila 2 nm dir. Her ne kadar bu çözünürlük elektronların dalga boyuna göre hesaplanandan çok daha az ise de, ışık mikroskoplarının çözücü gücünün yüz misli üzerinde bir ilerlemeyi simgeler.

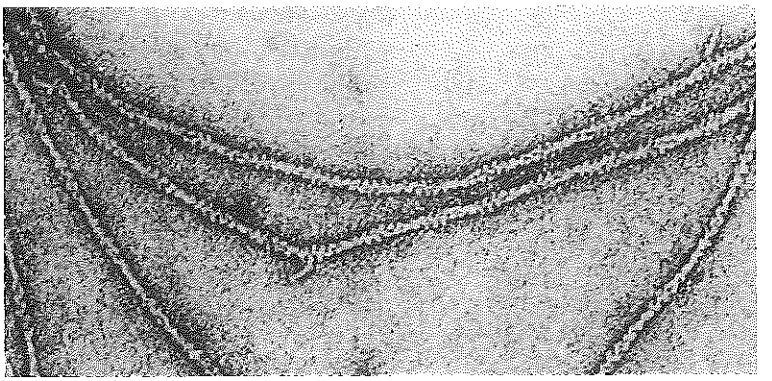
Elektron mikroskopisinin iki tipi - transmisyon ve tarama elektron mikroskopisi- hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Prensip olarak, **transmisyon elektron mikroskopisi,** boyanmış hücrelerin aydınlık-alan mikroskobu ile gözlenmesine benzer. Örnekler sabitlenip, saçılan elektronlar ile kontrast veren ağır metal tuzları ile boyanır. Daha sonra, bir elektron demeti örnekten geçirilip, floresan bir ekran üzerinde görüntü oluşturmak üzere odaklanır. Örnekten geçerken ağır metal iyonu ile karşılaşan elektronlar sapar ve son görüntüde payları olmaz ve böylece örneğin boyanan bölümleri karanlık görünür.



Şekil 1.33 Pozitif boyama
Pozitif boyanmış beyaz kan hücrelerinin transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. (Don W.Fawcett / Visuals Unlimited.)

Transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmek istenen örnekler negatif veya pozitif boyama ile hazırlanabilir. Pozitif boyamada, doku örnekleri ince kesitler halinde kesilir, lipidler, proteinler ve nükleik asit ile reaksiyona girebilen ağır metal tuzları (osmium tetroksit, üranil asetat ve kurşun sitrat gibi) ile boyanır. Bu ağır metal iyonları, son görüntüde karanlık gözükecek olan çeşitli hücre yapılarına bağlanırlar (Şekil 1.33). Alternatif pozitif boyama yöntemleri de hücrelerdeki belirli makro molekülleri saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, elektron- yoğunluklu ağır metallerle (altın parçacıkları gibi) işaretlenmiş antikorlar, elektron mikroskobunda spesifik proteinlerin hücre içi yerleşimlerini belirlemek amacı ile kullanılmaktadır. Bu yöntem, floresan mikroskopisinde, floresan boyalar ile işaretlenmiş antikorların kullanımına benzemektedir.

Negatif boyama; bakteriler, izole edilmiş hücre içi organeller ve makro moleküller gibi bütün halindeki biyolojik yapıların görüntülenmesi için kullanılır (Şekil 1.34). Bu yöntemde, biyolojik

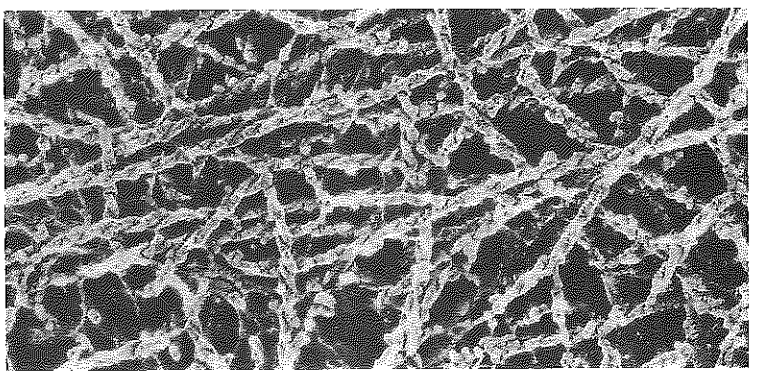


Şekil 1.34 Negatif boyama
Negatif boyanmış aktin flamanlarının transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. (Roger Craig'in katkısı, University of Massachustts Medical Center.)

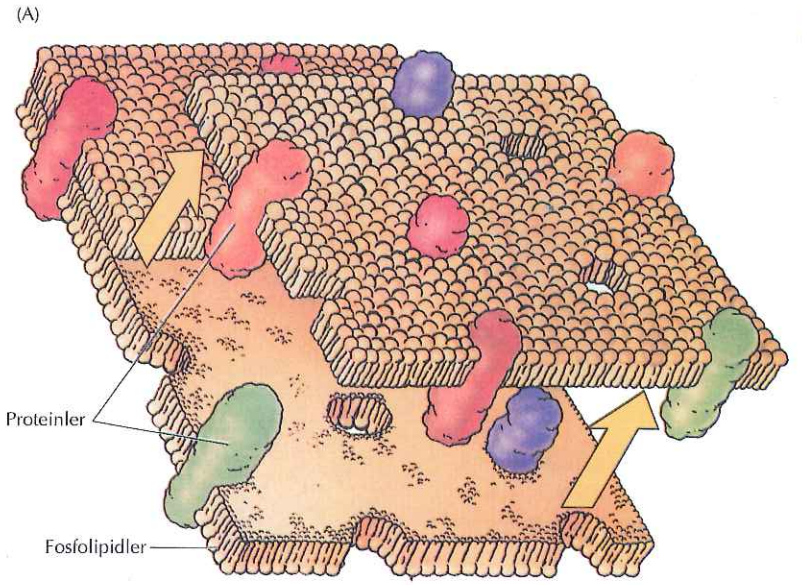
örnek destekleyici bir ince tabaka üzerine konur ve bir ağır metal boyanın, bu örneğin yüzeyi etrafında kuruması sağlanır. Boyanmamış örneğin çevresi, elektron yoğunluklu bir boya tabakası ile kaplanır ve bu sayede karanlık arka plan üzerinde örnek aydınlık görünür.

Metal gölgeleme yöntemi, izole edilmiş hücre içi yapıların veya makro moleküllerin yüzeylerinin transmisyon elektron mikroskobunda görüntülenmesinde kullanılan diğer bir tekniktir (Şekil 1.35). Örnek, platin gibi, buharlaştırılan ince bir metal katmanı ile kaplanır. Metal, buharlaştırılan metal moleküllerinin kaynağına bakan örnek yüzeyinin diğer taraflardan daha yoğun metal kaplanacağı bir açıdan örnek üzerine püskürtülür. Bu farklı kaplama bir gölge etkisi yaratır, böylece örneğin elektron mikroskop görüntüleri üç boyutlu gözükür.

Örneklerin, metal gölgelemesi ile kombine olarak **dondurup-çatlatma** yöntemi ile hazırlanması, özellikle zar yapılarının araştırılmasında önem kazanmıştır. Örnekler sıvı azot içerisinde (-196°C) dondurulur ve daha sonra bir bıçak ağzıyla çatlatılır. Bu işlem genellikle, hücre zarının iç yüzeyini açığa çıkaracak şekilde, lipid çift tabakayı ikiye ayırır (Şekil 1.36). Daha sonra örnek platin ile gölgelenir, biyolojik materyal asit ile çözülerek, örnek yüzeyinin metal kalıbı elde edilir. Bu kalıplar elektron mikroskobunda incelendiğinde, lipid çift tabakayı kat eden proteinlere uyan birçok yüzey çıkıntısı görülür. Dondurup-çatlatma yönteminin, dondurup-şekil çıkartma olarak isimlendirilen değişik bir tipi, hücre zarlarının iç yüzlerine ek olarak dış yüzeylerinin de görüntülenmesini sağlar.

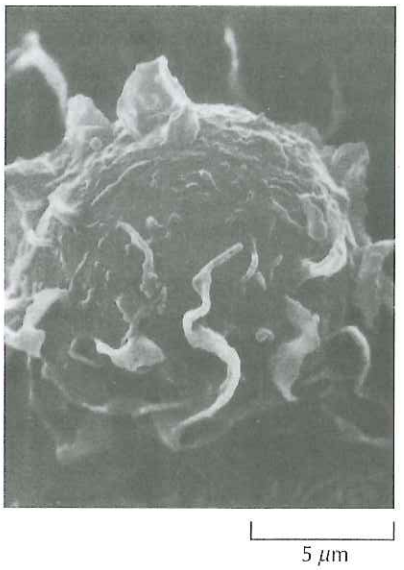


Şekil 1.35 Metal gölgeleme
Metal gölgeleme ile hazırlanan hücre iskeleti aktin / miyozin flamanlarının elektron mikroskop görüntüsü. (Don W. Fawcett, J. Heuser / Photo Researchers, Inc.)



Şekil 1.36 Dondurup- çatlatma
(A)Dondurup-çatlatma lipid çift tabakasını ikiye ayırır, zara gömülü olan proteinler iki tabakadan birine bağlı kalır. (B) Bitişik iki hücrenin dondurulup-çatlatılmış plazma zarlarının mikroskop görüntüsü. Çift tabakayı kat eden proteinler zar içi partiküller olarak görülür (ok). (Don W. Fawcett / Photo Researchers, Inc.)

Elektron mikroskopisinin ikinci çeşidi olan **tarama elektron mikroskopisi**, hücrelerin üç boyutlu görüntülerinin elde edilmesi amacıyla kullanılır (Şekil 1.37). Tarama elektron mikroskopisinde elektron demeti, örneğin içinden geçmez. Bunun yerine, hücrenin yüzeyi ağır bir metal ile kaplanır ve bir elektron demeti kullanılarak, örnek baştan başa taranır. Elektron demeti hücre boyunca hareket ederken, örnek yüzeyinden geri gelen ya da saçılan elektronlar, üç boyutlu görüntü oluşturmak üzere, toplanır. Tarama elektron mikroskopisinin çözünürlüğü sadece 10nm kadar olduğundan, kullanımı, hücre içi organeller ya da makro moleküllerden ziyade, hücre bütününün incelenmesiyle sınırlıdır.



Şekil 1.37 Tarama elektron mikroskopisi
Bir makrofaja ait tarama elektron mikroskop görüntüsü. (David Philips/Visuals Unlimited.)

Hücreyi Alt Bileşenlerine Ayırma

Elektron mikroskobu hücre yapısının ayrıntılı görüntülenmesine olanak sağlamasına karşın, ökaryot hücrelerin çeşitli bileşenlerinin işlevlerinin tanımlanması için mikroskop tek başına yeterli değildir. Hücre içi organellerin fonksiyonları ile ilgili birçok sorunun yanıtlanabilmesi için, ökaryotik hücrelerin organellerini, biyokimyasal çalışmalarda kullanılabilecek şekilde, izole etmek gerektiği kanıtlanmıştır. Bu, genellikle, 1940 ve 1950'li yıllarda Albert Claude, Christian de Duve ve arkadaşları tarafından, hücrelerin bileşenlerini boyut ve yoğunluklarına göre ayırmak amacıyla geliştirilmiş olan **diferansiyel santirfügasyon** yöntemiyle sağlanır.

Hücrenin alt birimlerine ayrıştırılmasında ilk adım, hücrenin iç bileşenlerine zarar vermeden plazma zarının parçalanmasıdır. Bunun için, sonikasyon (yüksek frekansta sese maruz bırakma), mekanik homojenizatör ile öğütme veya yüksek-hızda blender uygulaması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu işlemlerin tümü, plazma zarlarını ve endoplazmik retikulumu küçük parçalara ayırırken, hücrenin diğer bileşenlerine (nukleus, lizozomlar, peroksizomlar, mitokondriler ve kloroplastlar gibi) zarar vermemektedir.

Parçalanmış hücre süspansiyonu (lizat ya da homojenat olarak adlandırılır), yerçekiminden 500,000 kat daha büyük bir kuvvet

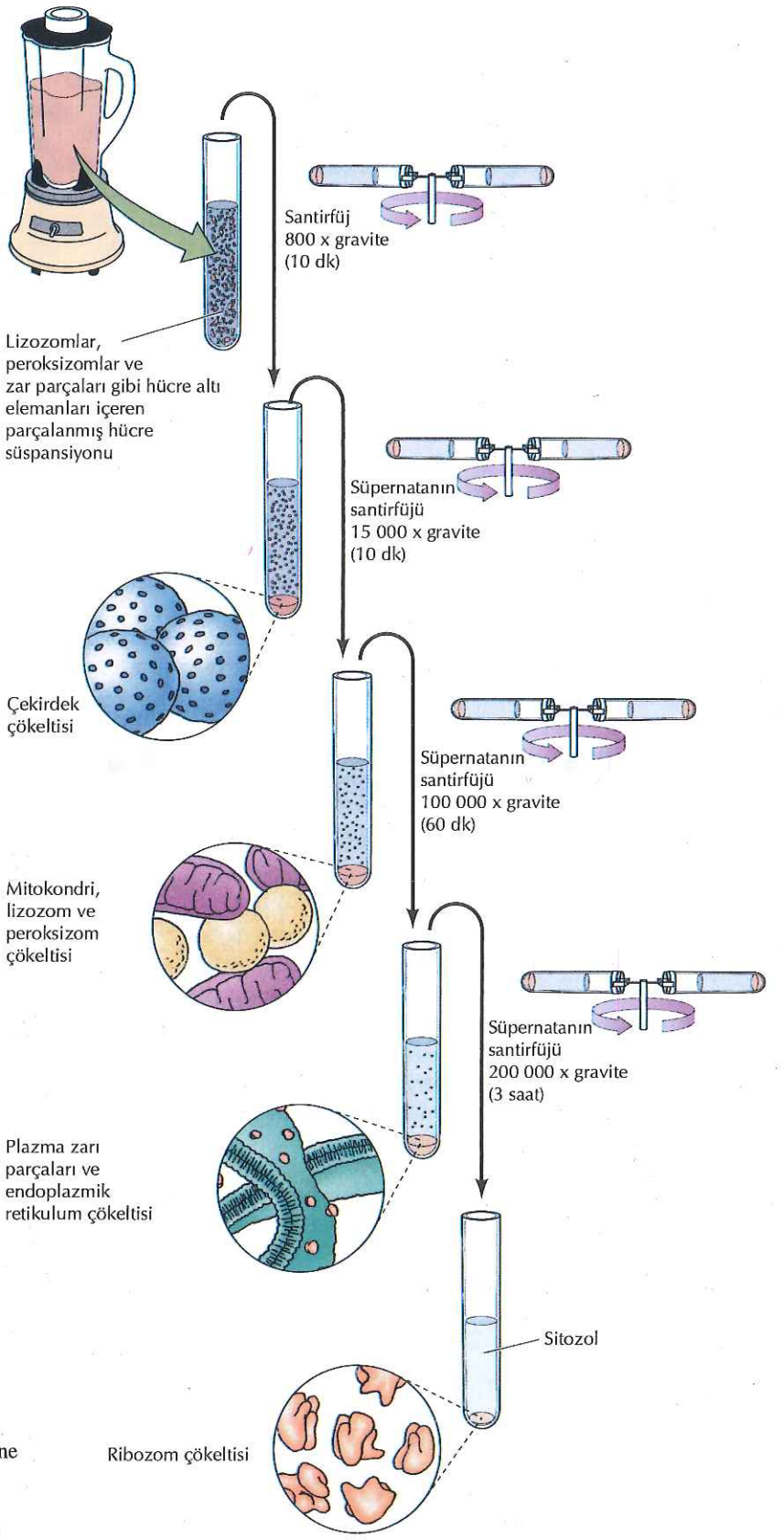
oluşturmak için, örnekleri çok yüksek hızlarda (100,000 rpm üzeri) çeviren bir **ultrasantirfüj** yardımıyla, bir dizi santirfügasyonla bileşenlerine ayrılır. Bu kuvvet, hücre bileşenlerinin büyüklüklerine ve yoğunluklarına bağlı bir hızla, en büyük ve en ağır olan en hızlı çökecek şekilde, santirfüj tüpünün dibine doğru hareket etmelerine ve bir çökelti oluşturmalarına (sedimantasyon denilen bir olay) sebep olur (Şekil 1.38). Hücre homojenatı önce, genellikle, düşük bir devirde santirfüjlenir, böylece, sadece parçalanmamış hücreler ve nükleuslar gibi en büyük hücre içi organeller çöker. Bu şekilde düşük hızdaki bir santirfüjle oluşan çökeltiden zengin bir nükleus fraksiyonu elde edilirken, diğer hücre bileşenleri süpernatanda (geri kalan çözelti) asılı durumda kalır. Süpernatan daha sonra daha yüksek devirde santirfüjlenerek, mitokondriler, kloroplastlar, lizozomlar ve peroksizomlar çöktürülür. Süpernatanın daha da hızlı devirde yeniden santirfüjlenmesi ile, plazma zarı ve endoplazmik retikulum parçaları çöktürülür. Daha da hızlı bir devirde dördüncü bir santirfüjleme ribozomları çöktürür ve geride, sadece, sitoplazmanın çözünen kısmı (sitozol) kalır.

Diferansiyel santrifüj ile, zenginleşmiş fakat hala saf olmayan organel fraksiyonları elde edilir. Daha ileri düzeyde bir saflaştırma, organellerin, sükroz gibi yoğun bir maddenin gradienti içerisinden geçirilerek çöktürüldüğü, **yoğunluk-gradient santirfügasyonu** ile elde edilebilir. **Hız santirfügasyonunda**, başlangıç materyali, sükroz gradientinin üzerine, tabaka oluşturacak biçimde eklenir (Şekil 1.39). Farklı büyüklükteki partiküller, gradiyent içerisinden geçerken farklı hızda çökerler ve ayrı bandlar halinde yürürler. Santirfügasyondan sonra belirli gradient fraksiyonlarının toplanmasıyla, mitokondriler, lizozomlar ve peroksizomlar gibi, benzer büyüklükteki organelerin ayırt edilmesi sağlanır.

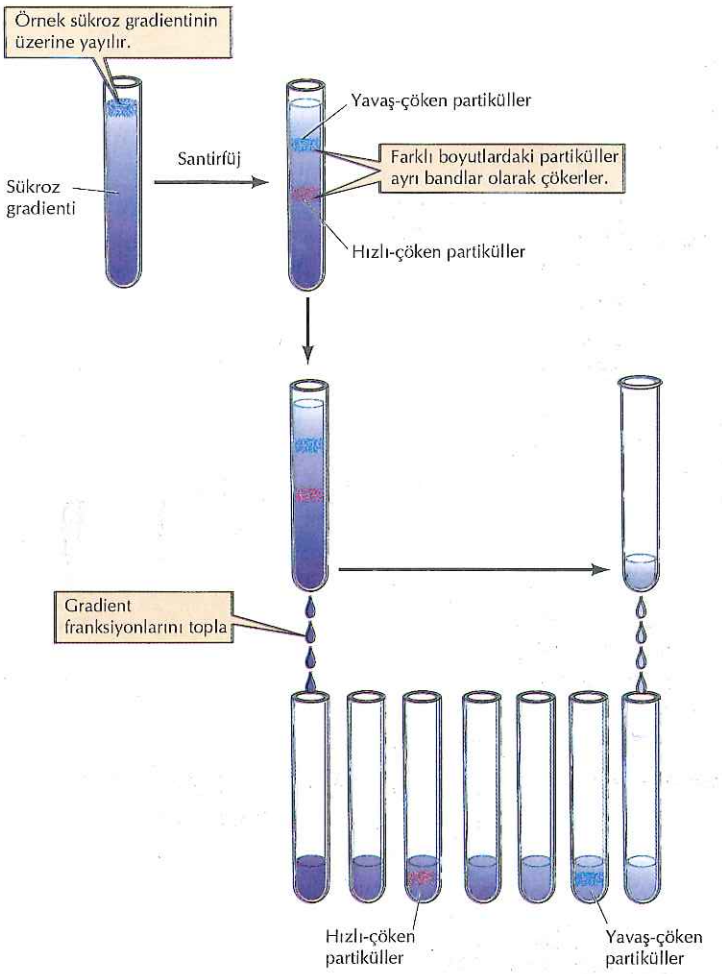
Yoğunluk gradientlerinde **denge santirfügasyonu**, hücre altı bileşenlerinin, büyüklük ve biçimlerinden bağımsız olarak, yüzme (buoyant) yoğunluğu temeline göre ayrıştırılması amacıyla kullanılabilir. Bu işlemde örnek, yüksek konsantrasyonda sükroz ya da sezyum klorid gradientinde santrifüj edilir. Örnek partiküller çökme hızlarına göre ayrılmaz, yüzme yoğunluklarının, içerisinde bulundukları sükroz ya da sezyum kloridinkine eşit olduğu denge konumuna erişene kadar santirfüjlenirler. Denge santrifüjü değişik tiplerdeki zarların birbirinden ayrılmasında kullanılabildiği gibi, farklı izotoplarla işaretlenmiş makro molekülleri ayırt edebilecek kadar da duyarlıdır. Bölüm 3'de bahsedilen klasik bir örnek, ağır ve hafif azot izotopları (^{15}N ve ^{14}N) içeren DNA moleküllerinin, DNA replikasyonunun analizi amacıyla, sezyum kloridli denge santrifügasyonu ile ayrılmasıdır.

Hayvan Hücrelerinin Kültürde Üretilmesi

Hücrelerle çalışılabilmesi, büyük ölçüde, laboratuvarda ne kadar kolay çoğaltılabileceklerine ve kullanılabilirliklerine bağlıdır. Bu işlem her ne kadar, bakterilerin veya mayaların kültüründen teknik olarak çok daha zor ise de, bir çok hayvan ve bitki hücre çeşidi kültürde çoğaltılabilir ve ustalıkla kullanılabilir. Bu gibi *in vitro* hücre kültürü sistemleri, bilim adamlarına, hücre gelişimi ve farklılaşması üzerine çalışma imkanı vermesinin yanı sıra, gen yapısının ve fonksiyonlarının anlaşılması için gerekli olan genetik incelemelere de olanak sağlamıştır.



Şekil 1.38 Hücreyi alt bileşenlerine ayırma
Hücreler patlatılır ve hücre alt bileşenleri, artan hızlarda bir dizi santirfügasyonla ayrılır. Her santirfüjleme sonrasında, tüpün dibine çökmüş olan organeller çökelti ile alınır. Daha sonra süpernatan daha yüksek bir devirde tekrar çevrilerek sıradaki büyük organel çöktürülür.

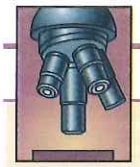


Şekil 1.39 Yoğunluk gradientinde hız santirfügasyonu
Örnek, sükroz gradientinin üzerine yayılır ve farklı boyutlardaki partiküller, gradient içerisinde ayrı bandlar halinde çökerler. Birbirinden ayrılan partiküller daha sonra, tüpün dibini delip damlaları toplayarak, basitçe, ayrı fraksiyonlar halinde elde edilir.

Hayvan hücre kültürleri, bir parça dokuyu hücrelerine ayırıp, besi ortamı içeren kültür kabına süspansiyon halinde ekleyerek başlatılır. Fibroblastlar ve epitel hücreleri gibi bir çok hayvan hücre tipi, hücre kültürü için kullanılan kabın plastik yüzeyine tutunarak çoğalırlar (Şekil 1.40). Hızla çoğalan hücreler içermeleri sebebiyle, embriyolar ve tümörler başlangıç materyali olarak sıklıkla kullanılırlar. Embriyo fibroblastları kültürde oldukça iyi üremeleri nedeniyle, en yaygın olarak kullanılan hayvan hücresi tiplerindendir. Bununla birlikte, uygun koşullar altında, bir çok farklı hücre tipi de kültürde çoğaltılabilir ve böylece, kontrollü deneysel koşullarda farklılaşan özellikleri incelenebilir. **Embriyonik kök hücreler** özellikle değinilmesi gereken bir örnektir. Erken embriyodan alınarak kültürü hazırlanan bu hücreler erişkin organizmalarda mevcut tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerini korurlar. Sonuç olarak, embriyonik kök hücreler, fare gelişiminde görevli çeşitli genlerin işlevlerinin araştırılmasında önemli rol oynamışlardır. İnsan hastalıklarında, transplantasyon uygulamaları için doku kaynağı sağlayarak, tedaviye katkıda bulunabilme olanağı sunmaktadır.

Hayvan hücrelerinin çoğalması için gerekli kültür ortamı, bakteri ve mayaların çoğalmasını sağlamak için yeterli olan minimal ortamdan çok daha karmaşıktır. İlk hücre kültürü çalışmalarında, plazma, serum ve embriyo özütü gibi tam olarak tanımlanmamış bileşenler kullanıldı.

Şekil 1.40 Kültürdeki hayvan hücreleri
Bir kültür kabının yüzeyine tutunmuş insan fibroblastlarının taramalı elektron mikroskop görüntüsü. (David M. Phillips / Visuals Unlimited.)



ANAHTAR DENEY

Hayvan Hücre Kültürü

Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture
Harry Eagle
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volume122, 1955, pages 501 – 504

Harry Eagle

Bağlam

İlk hücre kültürleri, doku fragmanlarından alınan ve plazma pıhtısı içine gömülen hücrelerin çoğalması şeklinde idi, ki bu, deneysel incelemeler için uygun olmaktan çok uzak bir kültür sistemiydi. En büyük ilerleme, 1940'ların sonlarında, izole edilmiş hücrelerin kültür kaplarının yüzeylerine tutunarak çoğaldıkları hücre hatlarının geliştirilmesiydi. Ancak bu hücreler, hala, serum ve embriyo özütünün değişen bileşimlerinden ibaret, tanımlanmamış ortamlarda çoğaltılıyordu. Örneğin; yaygın olarak kullanılan bir insan kanser hücre hattı (HeLa hücreleri olarak adlandırıldı), 1952'de ilk olarak, tavuk plazması, sığır embriyo özütü ve insan plasentası kordon serumundan oluşmuş ortamda çoğaltılarak hazırlandı. Bu şekildeki karmaşık ve tanımlanmamış kültür ortamlarının kullanımı, hayvan hücrelerinin spesifik büyüme gereksinimlerinin analizini imkansız kılmaktaydı. Bu sorunu ilk çözen kişi, hayvan hücrelerinin kültürde üremesini destekleyecek gerekli besinleri sistemli bir şekilde inceleyen, Harry Eagle'dır.

Deneyler

Eagle, iki gelişmiş hücre hattının çoğalmasını inceledi: HeLa hücreleri ve L hücreleri denilen bir fare fibroblast hattı. Bu hücreleri; tuzlar, karbohidratlar, amino asitler ve vitaminler içeren ve serum proteini eklenmiş bir ortamda üretebildi. Eagle, bu ortamın bileşenlerini sistematik bir şekilde değiştirerek, hücre çoğalması için gerekli spesifik besinleri belirlemeyi başardı. Bu besinler, tuzlara ve glukoza ek olarak, 13 amino asit ve bir kaç vitamin içeriyordu. Ayrıca az miktarda serum proteini de gerekliydi. Eagle tarafından geliştirilmiş olan bazal ortam, 1955 yayınından alınan aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Etki Gücü

Eagle tarafından geliştirilen ortam, halen hayvan hücre kültürleri için kullanılan temel ortamdır. Bu besi yerinin kullanımı, bilim adamlarının, çeşitli hayvan hücrelerini, tanımlanmış deney koşullarında üretebilmelerine olanak sağlamış ve hayvan hücrelerinin üreme ve farklılaşmalarının araştırılması ile serumda bulunan büyüme faktörlerinin tanımlanması açısından önemli olmuştur. Bu gün, serumun, canlı hayvanda hücrelerin davranışlarını denetleyen polipeptidleri içerdiği bilinmektedir.

Table 4. Basal media for cultivation of the HeLa cell and mouse fibroblast (*10*)

L-Amino acids* (m*M*)		Vitamins‡ (m*M*)		Miscellaneous	
Arginine	0.1	Biotin	10^{-3}	Glucose	5m*M*§
Cystine	0.05 (0.02)†	Choline	10^{-3}	Penicillin	0.005%#
Glutamine	2.0 (1.0)‖	Folic acid	10^{-3}	Streptomycin	0.005%#
Histidine	0.05 (0.02)†	Nicotinamide	10^{-3}	Phenol red	0.0005%#
Isoleucine	0.2	Pantothenic acid	10^{-3}		
Leucine	0.2 (0.1)†	Pyridoxal	10^{-3}		
Lysine	0.2 (0.1)†	Thiamine	10^{-3}	For studies of cell nutrition	
Methionine	0.05	Riboflavin	10^{-4}	Dialyzed horse serum, 1%†	
Phenylalanine	0.1 (0.05)†			Dialyzed human serum, 5%	
Threonine	0.2 (0.1)†	Salts§ (m*M*)			
Tryptophan	0.02 (0.01)†			For stock cultures	
Tyrosine	0.1			Whole horse serum, 5%†	
Valine	0.2 (0.1)†	NaCl	100	Whole human serum, 10%	
		KCl	5		
		$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1		
		$NaHCO_3$	20		
		$CaCl_2$	1		
		$MgCl_2$	0.5		

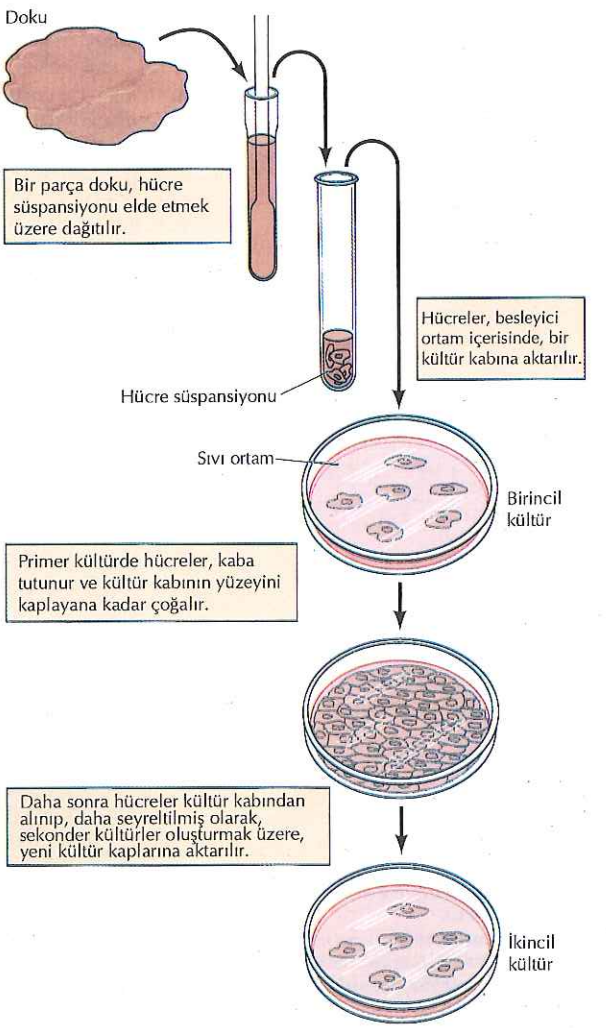
* Conveniently stored in the refrigerator as a single stock solution containing 20 times the indicated concentration of each amino acid.
† For mouse fibroblast.
‡ Conveniently stored as a single stock solution containing 100 or 1000 times the indicated concentration of each vitamin; kept frozen.
§ Conveniently stored in the refrigerator in two stock solutions, one containing NaCl, KCl, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$, and glucose at 10 times the indicated concentration of each, and the second containing $CaCl_2$ and $MgCl_2$ at 20 times the indicated concentration.
‖ Conveniently stored as a 100m*M* stock solution; frozen when not in use.
Conveniently stored as a single stock solution containing 100 times the indicated concentrations of penicillin, streptomycin, and phenol red.

Önemli bir gelişme, 1955'de Harry Eagle'ın, hayvan hücrelerinin üremesine uygun ilk tanımlanmış ortamı geliştirmesiyle gerçekleşti. Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan ortam, tuzlara ve glukoza ek olarak, hücrelerin kendilerinin yapamadığı çeşitli amino asitleri ve vitaminleri de içerir. Kültürdeki hücrelerin çoğu için kullanılan çoğalma ortamları, hücre bölünmesini uyarmak için gerekli polipeptid büyüme faktörlerinin kaynağı olarak serum içerirler. Bu büyüme faktörlerinden birkaçı tanımlanmıştır. Çok hücreli organizmalarda, farklı hücrelerin birbiriyle iletişim kurmasını sağlayan sinyaller oluşturarak, hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının önemli düzenleyicisi görevini yaparlar. Örneğin, hayvan deri fibroblastlarının önemli bir fonksiyonu, bir kesilme ya da yaralanma sonucu oluşan hasarı onarmak üzere çoğalmalarıdır. Kanın pıhtılaşması sırasında plateletlerden salınan büyüme faktörü, hasarlı doku yakınındaki fibroblastların çoğalmasını uyararak, bölünmelerini başlatır. Farklı büyüme faktörlerinin tanımlanması, çeşitli hücreleri serumsuz ortamlarda (ilgilenilen hücrenin çoğalabilmesi için gerekli büyüme faktörünün, serum yerine kullanıldığı ortam) kültürde çoğaltılmasına olanak sağlamıştır.

Bir dokudan hazırlanan başlangıç hücre kültürlerine **birincil kültürler** denir (Şekil 1.41). Birincil kültürdeki hücreler, genellikle, kültür kabının yüzeyini kaplayıncaya kadar çoğalırlar. Daha sonra, kültür kabından alınır ve seyreltilerek, ikincil kültürleri oluşturmak üzere, tekrar kültür kaplarına konur. Bu işlem defalarca tekrarlanabilir, ancak normal hücrelerin çoğu kültürde sonsuza kadar çoğaltılamaz. Örneğin, normal insan fibroblastları genellikle, 50 ila 100 kez populasyonu ikiye katlar, sonra üremeyi durdurur ve ölürler. Buna karşın, embriyonik kök hücreler ve tümörlerden alınan hücreler çoğunlukla, kültürde süresiz çoğalırlar ve sürekli ya da ölümsüz **hücre hatları** olarak tanımlanırlar. Buna ilave olarak, normal kemirgen fibroblast kültüründen, çok sayıda, ölümsüz hücre hattı izole edilmiştir. Benzerlerinin çoğunun yaptığı gibi ölmek yerine, bu kültürlerdeki birkaç hücre sınırsız olarak çoğalmayı sürdürür ve tümörlerden elde edilenlere benzeyen hücre hatları oluştururlar. Bu tür sürekli hücre hatları, kullanışlı, klonlanabilen ve laboratuvarda sonsuz çoğaltılabilen, sürekli ve tek tip hücre kaynağı sağladıklarından, bir çok deneyde özellikle kullanılmıştır.

Optimal koşullar altında dahi, aktif olarak çoğalan çoğu hayvan hücresi 20 saat aralarla bölünür, ki bu, mayanın bölünme aralığından 10 kat daha uzundur. Bu nedenle, hayvan hücre kültürleriyle araştırma yapmak, bakteri ve mayalara göre, daha zordur ve daha fazla zaman alır. Örneğin; tek hücreden üretilen *E.coli* veya maya kolonileri bir gecede ortaya çıktığı halde, tek bir hayvan hücresinin görülebilir koloni oluşturması en az bir hafta, hatta daha fazla sürer. Yine de, hücre yapısını ve fonksiyonlarını anlayabilmemiz için, kültürdeki hayvan hücrelerini genetik araştırmalarda kullanmamız kaçınılmazdır.

Şekil 1.41 Hayvan hücresi kültürü



Şekil 1.42 Kültürdeki bitki hücreleri
Katı bir ortamda üreyen farklılaşmamış bitki hücreleri yığını (kallus). (John N.A.Lott / Biyological Photo Service)

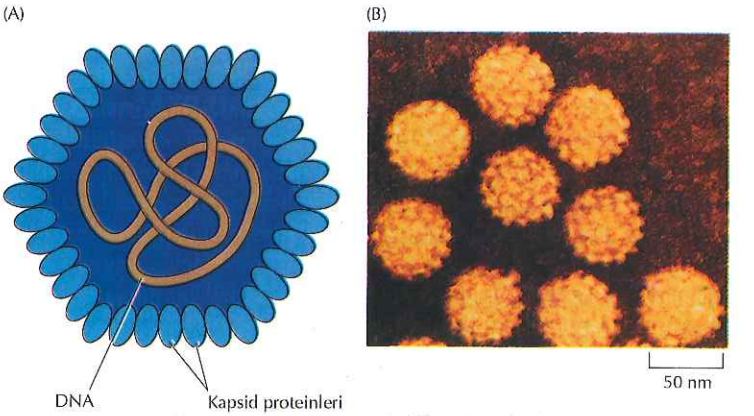
Bitki Hücresi Kültürleri

Bitki hücreleriyle de, uygun büyüme regülatör moleküllerini içeren besi ortamı içerisinde, kültür hazırlanabilir. Hayvan hücrelerinin çoğunun üremesini düzenleyen polipeptit büyüme faktörlerinin aksine, bitki hücrelerinin büyüme regülatörleri, bitki hücre duvarından geçebilen küçük moleküllerdir. Bu üreme regülatör moleküllerinin uygun karışımının sağlandığı koşulda, bir çok bitki hücre tipi kültürde çoğalır ve **kallus** adı verilen bir farklılaşmamış hücre kümesi oluşturur (Şekil 1.42).

Bitki hücrelerinin çoğunun, sonunda bitkininin tümünü oluşturmak için gerekli olacak, farklı hücre ve doku tiplerinden her birini oluşturabilme yetisinde olduklarını belirtmek gerekir. Sonuç olarak, besinlerin ve üreme regülatör moleküllerinin uygun kullanımıyla, kültürdeki farklılaşmamış bitki hücreleri, kökler, gövdeler ve yapraklar gibi çeşitli bitki dokularını oluşturmak üzere uyarılabilir. Çoğu zaman, kültürdeki tek bir hücreden bütün bir bitki geliştirilebilir. Kültürde tek hücreden yeni bir bitki oluşturabilmesi, teorik yararının yanı sıra, bitkilerde genetik değişiklikler yapılmasını kolaylaştırır ve tarımsal genetik mühendislikte önemli olanaklar sağlanır.

Viruslar

Viruslar, kendi başlarına replike olamayan, hücre içi parazitlerdir. Konakçı hücreleri enfekte edip, hücre mekanizmasını zorla kullanarak, daha çok virus partikülü oluşturmak üzere çoğalırlar. En basit şekliyle viruslar, bir protein kılıfla sarılmış olan genomik nükleik asitten (DNA ya da RNA) ibarettir (Şekil 1.43). Hücre fonksiyonlarının incelenmesinde kullanılabilecek basit sistemler olduklarından, viruslar, moleküler ve hücre biyolojisi için önemlidirler. Virusun çoğalması, enfekte hücrelerin metabolizmasına bağlı olduğu için, viruslarla yapılan çalışmalar hücre biyolojisinin bir çok temel konusuna açıklık getirmiştir. Bakteri viruslarıyla yapılan çalışmalar moleküler genetiğin temel mekanizmalarını anlamamıza büyük ölçüde katkıda bulunmuş ve bitki virusu (tütün mozaik virusu) ile yapılan araştırmalar RNA'nın genetik potansiyelini ilk kez göstermiştir. Hayvan virusları, ökaryotik hücrelerin çeşitli aktivitelerinin araşırılması için, özel duyarlıkta problar sağlamaktadır.



Şekil 1.43 Bir Hayvan Virusunun Yapısı
(A) Papillomavirus partikülleri, protein kılıf (kapsid) içerisinde sarılmış küçük bir çembersel DNA molekülü içerir. (B) İnsan papillomavirus partiküllerinin elektron mikroskop görüntüsü. Yapay renk eklenmiştir. (B, Linda Stannard / Science Photo Library / Photo Researchers, Inc.)

MOLEKÜLER TIP

Viruslar ve Kanser

Hastalık

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize edilen bir hastalık grubudur. Normal hayvan hücrelerinin çoğalması, organizmanın tamamının ihtiyaçlarına göre sıkı şekilde denetlenir. Buna karşın, kanser hücreleri düzensiz olarak çoğalır ve en sonunda, normal doku ve organların fonksiyonlarını ele geçirir ve engellerler. Kanser, Birleşik Devletler'de, ikinci en yaygın ölüm nedenidir (kalp hastalıklarından sonra). Yaklaşık olarak, her üç Amerikalı'dan biri hayatının bir döneminde kansere yakalanacak ve tedavideki önemli gelişmelere rağmen, her dört Amerikalı'dan biri sonunda bu hastalıktan ölecektir. Kanserin sebeplerini anlaşılması ve kanser tedavisinde daha etkili yöntemlerin geliştirilmesi, bu nedenle, tıp araştırmalarının ana hedefidir.

Moleküler ve Hücresel Temel

Bu gün, kanserin, normalde hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmekte. Bu genlerin tanımlanmasına yol açan en önemli yaklaşım, hayvanlarda kansere neden olan ve prototipi 1911'de Peyton Rous tarafından izole edilen, viruslarla yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Rous, tavuklardaki sarkomların (bağ dokusu kanserleri), bugün Rous sarkoma virusu veya RSV olarak bilinen bir virusla bulaştığını buldu. RSV, sadece 10,000 baz çiftlik genoma sahip bir retrovirus olduğundan, moleküler analizler için, tavuk veya diğer hayvan hücrelerinin kompleks genomlarından çok daha uygundur. Bu gibi çalışmalar en sonunda, viruslarda bulunan ve kanser-nedeni olan spesifik bir genin (onkogen) tanımlanmasına ve insanlar dahil tüm omurgalıların normal hücrelerinde de benzer genlerin keşfine yol açtı. İnsanlardaki bazı kanserlere virusların sebep olduğu bugün bilinmektedir; diğerleri, ilk kez RSV'de tanımlanmış olan onkogene benzeyen, normal hücre genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

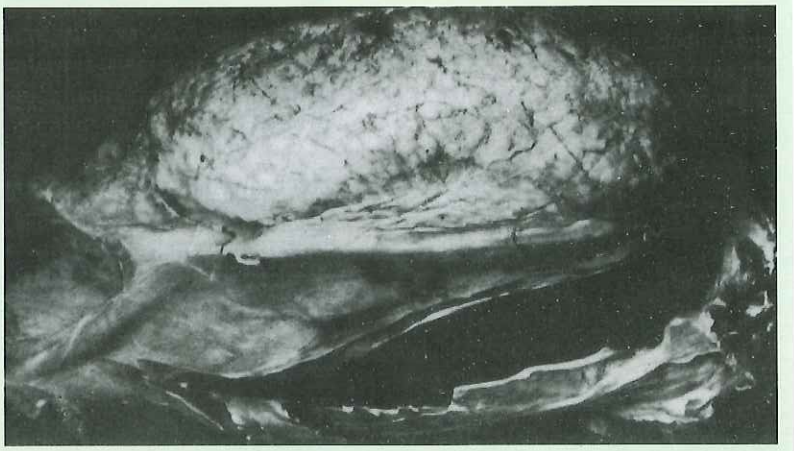
Korunma ve Tedavi

Virusların sebep olduğu insan kanserleri; servikal ve diğer anogenital kanserler (papilloma virusları), karaciğer kanseri (hepatit B ve C virusları) ve bazı lenfoma türleridir (Epstein-Barr virusu ve insan T-hücresi lenfotropik virusu). Virusla indüklenen bu kanserler, dünya çapındaki kanser olgularının yaklaşık olarak %20'sini oluşturur. Aslında, bu kanserler, sorumlu virusa karşı aşılama ile önlenebilir ve hepatit B viruslarına karşı geliştirilen etkin bir aşı ile bu alanda önemli gelişme sağlanmıştır.

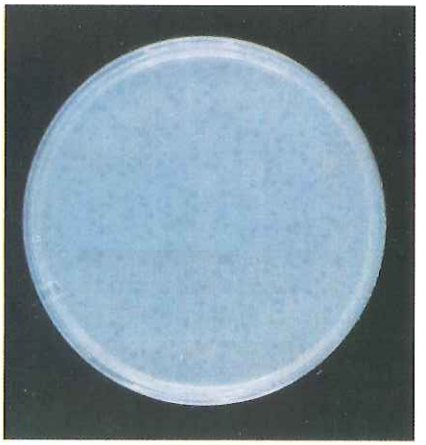
Diğer insan kanserlerinin nedeni, normal hücre genlerinde meydana gelen mutasyonlardır, bunlar kalıtımla edinilmez, kişinin yaşam sürecinde ortaya çıkarlar. Kansere neden olan viruslarla yapılan araştırmalar, virusların sebep olmadığı kanserlerden sorumlu olan genlerin birçoğunun tanımlanmasını ve kanser gelişiminden sorumlu olan moleküler mekanizmasının anlaşılmasını sağlamıştır. Kanser moleküler ve hücresel biyolojisi konularında edinilen bilgilerin, kanser tedavisinde kullanılması için önemli çaba harcanmaktadır. Gerçekten, bir insan kanserinin tedavisinde etkili olan ilk ilaç (STI-571, Bölüm 15'de tartışılmıştır) RSV'nun onkogenine çok benzeyen bir gene karşı geliştirilmiştir.

Kaynak

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from the tumor cells. *J.Exp.Med.* 13: 397-411.



Rous sarkoma virusunun izole edildiği, transplante edilebilen tümör.



Şekil 1.44 Bakteriyofaj plakları
E.coli tabakası üzerinde T4 plakları görülmekte. Her plak tek bir virus partikülünün replikasyonundan ortaya çıkar. (E. C. S. Chen/Visual Unlimited)

Bakteriler, hızlı çoğalmaları ve küçük genom boyutları nedeniyle moleküler biyoloji araştırmaları için ideal deneklerdir ve bakteri virusları (bakteriyofajlar) bakteri genetiği çalışmalarını daha da kolaylaştırır. En önemli bakteriyofajlardan biri, *E. coli*'yi enfekte ederek çoğalan T4'dür. Tek bir T4 partikülü ile enfeksiyon, 20 ila 30 dakika içerisinde yaklaşık olarak 200 yeni virus partikülünün oluşmasına yol açar. Başlangıçta enfekte olan hücre patlar (erir, liziz) ve yeni hücreleri enfekte edecek olan, yeni oluşmuş virus partiküllerini ortama salar. Agar ortamında çoğalan bakteri kültüründe T4 replikasyonu, bakteri tabakası üzerinde, eriyen hücrelerin bulunduğu berrak alanlar (plak) oluşturur (Şekil 1.44). Enfeksiyon yapan virus partiküllerinin üreme ve analiz kolaylığı gibi, viral mutantların – örneğin bir *E.coli* suşunda üreyip diğerinde üremeyen viruslar- izolasyonu da kolaydır. Bu nedenle, moleküler genetik çalışmalarında T4, *E. coli*'den daha elverişlidir. Dahası, yaklaşık olarak 0.2 milyon baz çifti içeren T4 genomu, *E. coli*'nin kinden 20 kat daha küçüktür ve bu, üzerinde çalışılmasını daha da kolaylaştırır. En basitleri 3600 nükleotidlik RNA molekülleri içeren diğer bazı bakteriyofajlar, çok daha küçük genoma sahiptirler. Bakteri virusları, bu nedenle, moleküler genetikte son derece kolay deney sistemleri sağlarlar. Moleküler biyolojinin birçok temel kuralının aydınlatılmasına neden olan, büyük oranda, bu viruslarla yapılan çalışmalardır.

Hayvan hücresi genomunun çok daha karmaşık olması nedeniyle, hayvan hücresi ile yapılan araştırmalarda viruslar, bakterilerle yapılan çalışmalara göre çok daha fazla önem kazanmıştır. Bir çok hayvan virusu, bakteriyofajlarda olduğu gibi, hücre kültürlerinde çoğalır ve plak oluşumu ile incelenebilir. Ayrıca, hayvan viruslarının genomları karmaşıklık açısından bakteri viruslarınkine benzer (yaklaşık olarak 3,000- 300,000 baz çifti arasında değişir)olduğundan, hayvan virusları ile çalışmak konakçı hücreleriyle çalışmaktan çok daha kolaydır.

Her biri, genetik materyal olarak DNA ya da RNA içeren birçok, farklı hayvan virusu vardır (Tablo 1.3). RNA genomuna sahip olan virusların çoğu, enfekte ettikleri hücrelerde, RNA kalıbından genomlarının yeni RNA kopyalarını sentezleyerek replike olurlar. Bununla birlikte, **retroviruslar** olarak adlandırılan bir hayvan virusu ailesi, virus partiküllerinde RNA genomu içermelerine karşın, enfekte ettikleri hücrelerde, genomlarının bir DNA kopyasını sentezlerler. Bu viruslar, virusların model olarak önemini gösteren iyi bir örnektir,

TABLO 1.3 Hayvan Virusu Örnekleri

Virus ailesi	Temsilci üye	Genom büyüklüğü (bin baz çifti)
RNA genomlular		
Pikornaviruslar	Poliovirus	7-8
Togaviruslar	Rubella virusu	12
Flaviviruslar	Sarı humma virusu	10
Paramiksoviruslar	Kızamık virusu	16-20
Ortomiksoviruslar	İnfluenza virusu	14
Retroviruslar	İnsan immün yetmezlik virusu	9
DNA genomlular		
Hepadnaviruslar	Hepatit B virusu	3.2
Papovaviruslar	İnsan papillomavirusu	5-8
Adenoviruslar	Adenovirus	36
Herpesviruslar	Herpes simpleks virusu	120-200
Poksviruslar	Vaksinia virusu	130-280

çünkü, şu anda tüm ökaryotlarda da geçerli olduğu bildiğimiz bir genetik bilgi transfer şekli olan, RNA kalıplarından DNA sentezinin gerçekleştiği ilk kez retrovirus çalışmalarında gösterilmiştir. Konakçı hücrelerinin incelenmesinde hayvan viruslarının önemli model oldukları diğer örnekler, DNA replikasyonu, transkripsiyon, RNA işlenmesi ile, protein taşınımı ve salgılanmasıdır.

Özellikle belirtmek gerekir ki, bazı hayvan virusları ile enfeksiyon, konakçı hücreyi öldürmek yerine, normal hücreyi kanser hücresine dönüştürür. İlk kez Peyton Rous tarafından 1911 yılında tanımlanmış olan, kansere-sebep olan bu gibi viruslarla yapılan çalışmalar, sadece kanser hücresiyle ilgili bugünkü hücre ve moleküler biyoloji düzeyindeki bilgileri elde etmemizi sağlamakla kalmamış, aynı zamanda hayvan hücresinin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden birçok moleküler mekanizmanın aydınlanmasını da sağlamıştır.

ÖZET

HÜCRELERİN KÖKENİ VE EVRİMİ

İlk Hücre: Hem prokaryot hem de ökaryot, günümüzdeki tüm hücreler tek bir atadan gelmiştir. ilk hücrenin, en az 3.8 milyar yıl önce, kendini eşleyebilen RNA'nın fosfolipid bir zarla çevrilmesiyle ortaya çıktığı sanılmaktadır.

Metabolizmanın Evrimi: Metabolik enerjinin üretimini sağlayan ilk reaksiyonlar, bir çeşit anaerobik glikoliz formuydu. Daha sonra fotosentezin gelişimini oksidatif metabolizma takip etti.

Günümüz Prokaryotları: Günümüz prokaryotları, evrimin erken döneminde birbirinden uzaklaşmış olan, arkebakteriler ve öbakteriler olmak üzere iki guruba ayrılırlar.

Ökaryot Hücreler: Prokaryot hücrelerden çok daha büyük ve karmaşık olan ökaryot hücreler; nükleus, sitoplazmik organeler ve bir hücre iskeletine sahiptirler. Bunların, prokaryotların simbiyotik birlikteliğinden evrimleştikleri düşünülmektedir.

Çok Hücreli Organizmaların Gelişimi: En basit ökaryotlar, mayalar ve amipler gibi tek hücreli organizmalardır. Çok hücreli canlılar, bu gibi tek hücreli canlılar arasındaki birlikteliklerden ortaya çıkmış ve hücreler arasında iş bölümü, günümüz bitki ve hayvanlarını meydana getiren çok çeşitli özelleşmiş hücrenin gelişimine öncülük etmiştir.

DENEYSEL MODEL OLARAK HÜCRELER

E.coli: Genetik yapılarının basitliği ve çalışma kolaylığı nedeniyle, E.*coli* gibi bakteriler, biyokimya ve moleküler biyolojinin temel prensiplerinin araştırılması için oldukça kullanışlıdırlar.

Mayalar: En basit ökaryot hücre olarak, mayalar ökaryot hücre biyolojisinin çeşitli kavramlarını çalışmak için önemli örneklerdir.

Dictyostelium discoideum: Tek hücreli bir ökaryot olan *Dictyostelium*, hücre hareketlerin araştırılmasında geniş çapta kullanılır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

prokaryotik hücre, ökaryotik hücre, RNA dünyası, fosfolipid, amfipatik, hidrofobik, hidrofilik

adenozin 5'- trifosfat (ATP), glikoliz, fotosentez, oksidatif metabolizma

arkebakteriler, öbakteriler, siyanobakteriler, *Escherichia coli (E.coli)*, hücre duvarı, plazma zarı, ribozom

nükleus, mitokondri, kloroplast, lizozom, peroksizom, vakuol, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, hücre iskeleti, endosimbiyoz

mayalar, *Saccharomyces cerevisiae*, psödopod, epitel hücresi, fibroblast, eritrosit, granulosit, monosit, makrofaj, lenfosit, nöron

Dictyostelium discoideum

Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans: Nematod *C.elegans* gelişimsel biyolojide önemli bir model olarak kullanılan, basit, çok hücreli bir organizmadır.

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster: Yaygın genetik analizinden dolayı, meyve sineği *Drosophila* ile yapılan araştırmalar, hayvan gelişimini anlamamıza önemli katkı sağlamıştır.

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana: Küçük, çiçekli bir bitki olan *Arabidopsis*, bitki moleküler biyolojisi ve gelişimi ile ilgili çalışmalar için model olarak yaygınlıkla kullanılır.

Xenopus laevis, zebra balığı, transgenik fare

Omurgalılar: Omurgalı hücresinin bir çok tipi, kontrollü laboratuvar koşulları altında incelenebildikleri kültür ortamında çoğaltılabilirler. Nöronlar ve kas hücreleri gibi özelleşmiş hücre tipleri, hücre biyolojisinin belirli konularını araştırmak için kullanışlı model oluştururlar. Kurbağa *Xenopus laevis* ve zebra balığı, erken omurgalı gelişiminin incelenmesi için önemli modellerdir, fare de genetik analizler için uygun olan memeli türüdür.

HÜCRE BİYOLOJİSİNİN ARAÇLARI

rezolüsyon, aydınlık-alan mikroskopisi, faz-kontrast mikroskopisi, diferansiyel interferenz – kontrast mikroskopisi, video – geliştirilmiş diferansiyel interferenz – kontrast mikroskopisi, floresans mikroskopisi, yeşil floresan proteini (GFP), konfokal mikroskopi, multi-foton eksitasyon mikroskopisi

Işık Mikroskopisi: Işık mikroskobu, hücreleri ve hücre altı yapıları görüntülemek ve özel moleküllerin hücre içindeki yerleşimini belirlemek için çeşitli yöntemlerde kullanılır.

transmisyon elektron mikroskopisi, metal gölgeleme, dondurup çatlatma, tarama elektron mikroskopisi

Elektron Mikroskopi: Işık mikroskopisine göre yaklaşık olarak yüz kat daha büyük olan rezolüsyonu ile elektron mikroskopisi, hücre yapısının detaylarını incelemek için kullanılır.

diferansiyel santrifügasyon, ultrasantrifüj, yoğunluk-gradient santrifügasyonu, hız santrifügasyonu, denge santrifügasyonu

Hücreyi Alt Bileşenlerine Ayırma: Ökaryot hücrelerin organelleri, biyokimyasal analizler için, diferansiyel santrifügasyonla izole edilebilir.

Embriyonik kök hücre, primer kültür, hücre hattı

Hayvan Hücrelerinin Kültürde Üretilmesi: Hayvan hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, hücre üremesi ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmaların incelenmesine imkan vermiştir.

Kallus

Bitki Hücre Kültürü: Kültürde bulunan bitki hücreleri, özel hücre tiplerini oluşturmak üzere farklılaşabilir ve bazı durumlarda, tam bir bitkiyi yeniden oluşturabilir.

Bakteriyofaj, retrovirus

Viruslar: Viruslar, hücre işlevlerinin araştırılması için basit model sağlarlar.

Sorular

1. Yeryüzünde bulunan tüm canlı hücreler hangi temel özellikleri paylaşırlar? (En az üç tane bulunuz)
2. Organik moleküllerin oluşumu hakkında Stanley Miller'ın deneyleri ne göstermiştir?
3. Ne tip bir makro molekül kendi replikasyonunu yönetme kapasitesine sahip olabilir?
4. Fotosentezin evriminin, daha sonraki oksidatif metabolizma evrimini desteklediği neden düşünülmektedir?
5. Yaşamın başlangıcında, kendini eşleyebilen bir grup makro molekülün etrafında seçici geçirgen bir plazma zarının oluşumu neden, bu derece önemli bir adım oluşturmaktadır?

6. Mitokondrilerin ve kloroplastların, ökaryot hücre öncüleri tarafından yutulan bakterilerden köken aldığı görüşünün kanıtlarını tartışınız.

7. Bir örneğin yağ yerine hava içinden gözlenmesi halinde, bir ışık mikroskobu ile ne kadar çözünürlük elde edilir? Görünen ışığın dalga boyunu 0.5μm kabul ediniz.

8. Hücredeki bir proteinin yerleşiminin ve hareketinin incelenmesi için yeşil floresan proteininin kullanımı, floresanla işaretli antikor kullanımının ötesinde nasıl bir avantaj sağlar?

9. Organellerin, sükroz gradientinde hız santirfügasyonu ile ve sükroz gradientinde denge santirfügasyonu ile ayrılmalarını sağlayan, farklı karakteristik özelliklerini tanımlayınız.

10. Mayalar, ökaryot hücre biyolojisinin birçok alanında yapılan çalışmalar için model olarak kullanılmaktadır. Neden, hayvan hücresi hareketinin incelenmesi için uygun model değillerdir?

11. Embriyonik kök hücrelerin kültürünün yapılabilmesi neden önemlidir?

12. Primer hücre kültürleri ile ölümsüz hücre hatları arasındaki farkı belirtiniz.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Hücrelerin Kökeni ve Evrimi

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. Winkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature 396: 133-140. [P]

Brocks, J.J., G. A. Logan, R. Buick and R. E. Summons. 1999. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285: 1033-1036. [P]

Bult, C. J. and 39 others. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* 273: 1058-1073. [P]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4360-4363. [P]

Crick, F. H. C. 1968. The origin of the genetic code. J. Mol. Biol. 38: 367-379. [P]

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271-1275. [P]

Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124-2128. [R]

Gesteland, R. F., T. R. Cech and J. F., Atkins (eds.). 1999. *The RNA World.* 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gilbert, W. 1986. The RNA world. *Nature* 319: 618. [R]

Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel. 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* 292: 1319-1325. [P]

Joyce, G. F. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338: 217-224. [R]

Kasting, J. F. and J. L. Siefert. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296: 1066-1068. [R]

Knoll, A. H. 1992. The early evolution of eukaryotes: A geological perspective. *Science* 256: 622-627. [R]

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution.* 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117: 528-529. [P]

Mojzsis, S. J., G. Arrhenius, K. D. McKeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman and C. R. L. Friend. 1996. Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* 384: 55-59. [P]

Orgel, L. E. 1998. The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem. Sci.* 23: 491-495. [R]

Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740. [R]

Shixing, Z. and C. Huineng. 1995. Megascopic muiticellular organisms from the 1700-million-year-old Tuanshanzi formation in the Jixian area, north China. Science 270: 620-622. [P]

Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87: 4576-4579. [P]

Deneysel Model Olarak Hücreler

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science* 287: 2185-2195. [P]

Blattner, F. R., G. Plunkett III., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462. [P]

Botstein, D., S. A. Chervitz and J. M. Cherry. 1997. Yeast as a model organism. *Science* 277: 1259-1260, [R]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567. [P]

Hamilton, B. A. and W. N. Frankel. 2001. Of mice and genome sequence. *Cell* 107: 13-16. [R]

Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini and E. Lacey. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo.* 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Maliga, P., D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner (eds.). 1995. *Methods in Plant Molecular Biology.* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Meyerowitz, E. M. 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* 295: 1482-1485. [R]

Neidhardt, F. C., R. Curtiss III., J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low Jr., B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds.). 1996. Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and Molecular Biology.* 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

Sive, H. L., R. M. Grainger and R. M. Harland (eds.). 1999. *Early Development of* Xenopus laevis: *A Course Manual.* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature* 408: 796-815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans:* A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018. [P]

Thisse, C. and L. I. Zon. 2002. Organogenesis—heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 295: 457-462. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. Science 291: 1304-1351.[P]

Hücre Biyolojisinin Araçları

Bowers, W. E. 1998. Christian d e Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* 8:330-333 [R]

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 1992. *Phage and the Origins of Molecular Biology.* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chalfie, M. 1995. Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 62: 651-656. [R]

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189:433-435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189:186-194. [R]

Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 235: 442-447. [P]

Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 1999. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* Washington, DC: ASM Press.

Graham, J. and D. Rickwood (ed.). 1997. *Subcellular Fractionation: A Practical Approach.* New York: Oxford University Press.

Kam, Z., E. Zamir and B. Geiger. 2001. Probing molecular processes in live cells by quantitative multidimensional microscopy. *Trends Cell Biol.* 11:329-334. [R]

Lacey, A. J. (ed.) 1999. *Light Microscopy in Biology: A Practical Approach.* New York: Oxford University Press.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358. [R]

Piston, D. W. 1999. Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol.* 9: 66-69 [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy *J. Exp. Med.* 81: 233-246. [P]

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397-411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5:154-158. [R]

Spector, D. L., R. Goldman and L. Leinwand. 1998. *Cells: A Laboratory Manual.* Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tsien, R. Y. and A Miyawaki. 1998. Seeing the machinery of live cells. *Science* 280: 1954-1955. [R]

Bölüm 2

Hücre Kimyası

Hücrelerin Moleküler Bileşimi 41

Enzimlerin Biyolojik Katalizörler Olarak Merkezi Rolü 56

Metabolik Enerji 63

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi 74

Hücre Zarları 80

ANAHTAR DENEY: Polipeptid Zincirlerinin Katlanmaları 52

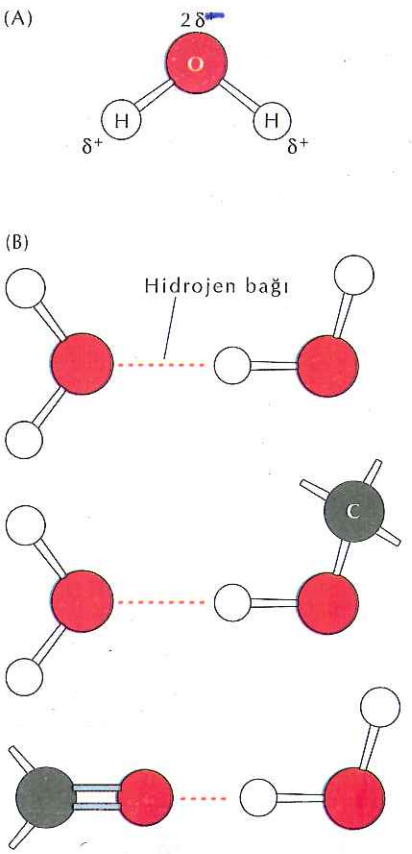
MOLEKÜLER TIP: Fenilketonüri 79

HÜCRELER SON DERECE KARMAŞIK VE ÇEŞİTLİLİK GÖSTEREN YAPILARDIR; yaşamın temelini oluşturan kendi kendini kopyalamanın yanı sıra, çok hücreli organizmalarda geniş bir özelleşimiş görevler yelpazesini gerçekleştirirler. Böyle olmakla birlikte, hücreler cansız sistemlerin davranışlarını belirleyen kimya ve fizik kurallarının aynılarına uyarlar. Dolayısıyla, modern hücre biyolojisi hücresel olayları kimyasal ve fiziksel reaksiyonlar çerçevesinde anlamaya çalışır.

Bu bölüm hücrelerin yaşamlarını yöneten temel biyolojik kimya ilkelerini ele almaktadır. Ne biyokimyanın geniş bir tartışmasını, ne de hücrelerin tüm metabolik reaksiyonlarını listelemeyi hedeflemektedir. Dolayısıyla, bu bölüm beş temel konu üzerinde odaklanmıştır: hücrelerde yer alan molekül türleri, proteinlerin biyolojik katalizörler olarak merkezi rolleri, metabolik enerjinin üretimi ve kullanımı, temel hücre bileşenlerinin biyosentezi ve biyolojik zarların yapıları. Bu kimyasal temellerin kavranması, kitabın sonraki bölümlerinde tartışılacak olan hücre yapı ve işlevinin çeşitli yönlerinin anlaşılmasına temel oluşturacaktır.

Hücrelerin Moleküler Bileşimi

Hücreler su, inorganik iyonlar ve karbon içeren (organik) moleküllerden oluşmuşlardır. Su, hücrelerde en çok bulunan molekül olup toplam hücre kitlesinin %70 ya da daha fazlasını oluşturur. Dolayısıyla, su ile hücrenin diğer bileşenlerinin etkileşimleri biyolojik kimyada büyük önem taşır. Bu çerçevede suyun kritik özelliği, hidrojen atomlarının kısmi pozitif yük, oksijenin de kısmi negatif yük taşımasıdır (Şekil 2.1). Su molekülleri, polar özellikleri nedeniyle, kendi kendileri ile, ya da, diğer polar moleküller ile hidrojen bağları kurabilirler ve de pozitif ya da negatif yüklü iyonlar ile etkileşebilirler. Bu etkileşimler sonucunda iyonlar ve polar moleküller suda kolayca çözünürler (hirofiliktirler). Buna karşın, nonpolar moleküller, su ile etkileşemediklerinden, sulu ortamda çok zayıf bir çözünürlüğe sahiptirler (hidrofobiktirler). Dolayısıyla, nonpolar moleküller kendileri aralarında birleşerek, su ile temaslarını en aza indirgeme



Şekil 2.1 Suyun Özellikleri
(A) Su, oksijen atomu üzerinde kısmi negatif yük (δ^-) ve hidrojen atomları üzerinde kısmi pozitif yük (δ^+) taşıyan polar bir moleküldür. Bu polarite (kutuplaşma) nedeniyle, su molekülleri ya kendileri ile, ya da diğer polar moleküller ile hidrojen bağları oluşturabilirler (B); ayrıca, yüklü iyonlar ile etkileşime girebilirler (C).

eğilimindedirler. Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, polar ve nonpolar moleküllerin su ile ve kendileri ile bu tür etkileşimleri, hücre zarları gibi biyolojik yapıların oluşumunda anahtar rol oynar.

Hücrenin sodyum (Na^+), potasyum (K^+), magnezyum (Mg^{2+}), kalsiyum (Ca^{2+}), fosfat (HPO_4^{2-}), klorür (Cl^-) ve bikarbonat (HCO_3^-) gibi inorganik bileşenleri hücre kitlesinin %1 ya da daha azını oluşturur. Bu iyonlar hücre metabolizmasının değişik yönleri ile ilişkilidirler ve hücre işlevinde kritik roller oynarlar.

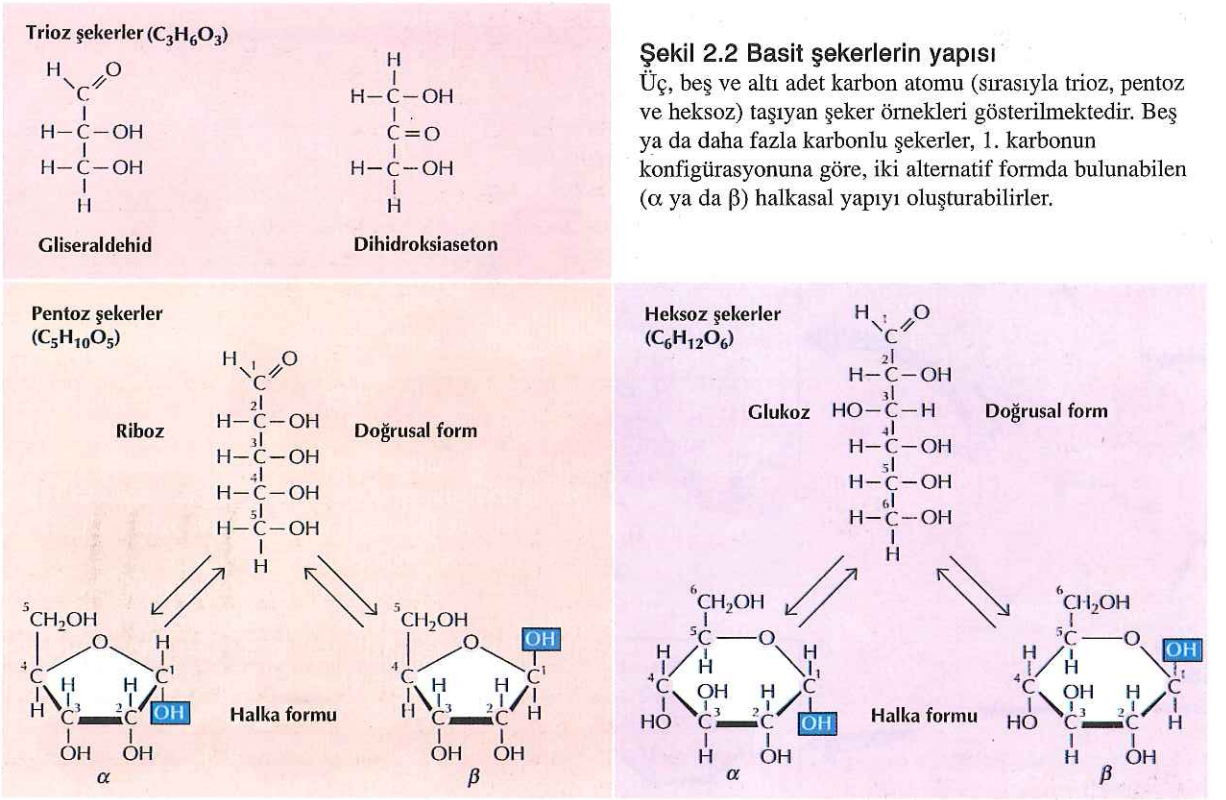
Ancak, hücrelerin özgün bileşenleri organik moleküllerdir. Bu organik bileşiklerin çoğunluğu, dört sınıf molekülden birine aittir: karbohidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler. Proteinler, nükleik asitler ve karbohidratların çoğu (polisakkaridler), yüzlerce ya da binlerce düşük molekül ağırlıklı öncül molekülün; sırasıyla, amino asitler, nükleotidler ve basit şekerlerin birleşmesiyle (polimerizasyon) oluşan makromoleküllerdir. Bu çeşit makromoleküller, birçok hücrenin kuru ağırlığının %80-90'ını oluştururlar. Lipidler, hücrelerin diğer bileşenleridir. Hücre kitlesinin kalan bölümü, makromoleküler öncüllerini de içeren çok çeşitli küçük organik moleküllerden oluşur. Hücrelerin temel kimyası, dört temel organik molekül sınıfının yapıları ve işlevleri ile anlaşılabilmektedir.

Karbohidratlar

Karbohidratlar basit şekerleri ve de polisakkaridleri kapsarlar. Glukoz gibi basit şekerler hücrelerin temel besin maddesidir. Bu bölümde daha sonra tartışıldığı gibi, bunların yıkılımı hem hücresel enerji kaynağını, hem de diğer hücre bileşenlerinin sentezi için başlangıç materyalini sağlarlar. Polisakkaridler şekerlerin depo formu ve hücrelerin yapısal bileşenini oluşturur. Aynı zamanda, polisakkaridler ile şekerlerin daha kısa polimerleri, hücrelerin komşularına adezyonu ve proteinlerin uygun intrasellüler hedeflere taşınmaları gibi birçok hücresel tanımayı gerektiren olaylarda "marker" (belirteç) olarak işlev yaparlar.

Şekil 2.2'de, seçilmiş bazı basit şekerlerin **(monosakkaridler)** yapıları gösterilmektedir. Bu moleküller için temel formül: $(CH_2O)_n$ olup, bundan "karbohidrat" terimi türemiştir (C = "karbo" ve H_2O = "hidrat"). Altı karbonlu (n=6) şeker olan glukoz ($C_6H_{12}O_6$) hücreler için, hücresel enerjinin temel kaynağını oluşturması yönünden, özellikle önemlidir. Diğer basit şekerler üç ila yedi arasında karbon içerirler ve en sıklıkla rastlananları üç ve beş karbonlu olanlardır. Beş ya da daha fazla karbon atomu içeren şekerler, halkasal yapı oluşturabilirler ve bunlar, hücrede sıklıkla rastlanan formlarıdır. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, halkasal şekerler, 1. karbonun konfigürasyonuna göre, α ya da β olarak iki alternatif formda bulunabilirler.

Monosakkaridler dehidrasyon tepkimeleri ile birleşebilirler; H_2O uzaklaştırılır ve şekerler, karbon atomları arasında oluşan bir **glikozidik bağ** ile birleşirler (Şekil 2.3). Eğer sadece birkaç şeker molekülü birleşmiş ise, oluşan polimer **oligosakkarid** adını alır. Büyük sayıda (yüzler veya binlerce) şeker söz konusu ise, oluşan polimer **polisakkaridler** olarak adlandırılan makromoleküllerdir.

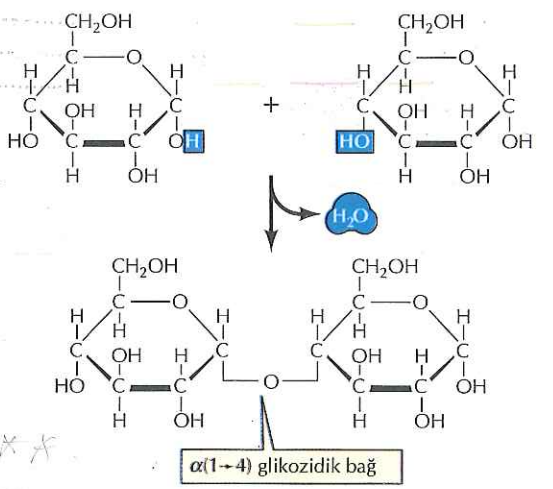


Şekil 2.2 Basit şekerlerin yapısı
Üç, beş ve altı adet karbon atomu (sırasıyla trioz, pentoz ve heksoz) taşıyan şeker örnekleri gösterilmektedir. Beş ya da daha fazla karbonlu şekerler, 1. karbonun konfigürasyonuna göre, iki alternatif formda bulunabilen (α ya da β) halkasal yapıyı oluşturabilirler.

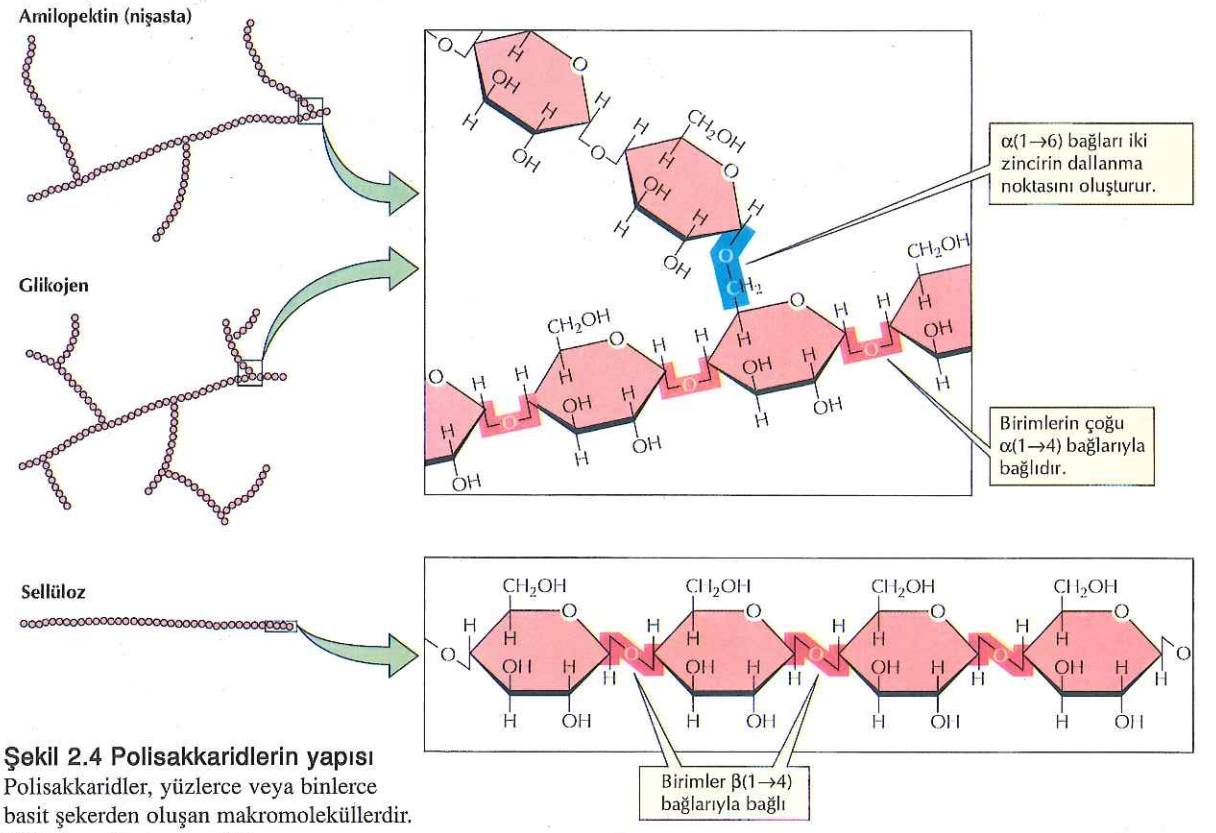
Sık rastlanan iki polisakkarid- glikojen ve nişasta- sırasıyla, hayvan ve bitki hücrelerinde karbohidratların depo formlarıdır. Hem glikojen, hem de nişasta, tamamiyle α konfigürasyonundaki glukoz moleküllerinden oluşurlar (Şekil 2.4). Temel bağlanma, bir glukozun 1. karbonu ile, ikinci bir glukozun 4. karbonu arasındadır. Buna ek olarak, hem glikojen, hem de nişastanın bir formu (amilopektin), ara ara, bir glukozun 1. karbonu ile ikincinin 6. karbonunun birleştiği α (1→6) glikozidik bağları içerirler. Şekil 2.4'de gösterildiği gibi, bu bağlanmalar, iki değişik α(1→4) zincirinin birleşmesi ile dallanmaları oluşturur. Bu tür dallanmalar, glikojen ve amilopektinde bulunur; diğer bir nişasta formu (amiloz) dallanma göstermeyen bir moleküldür.

Glikojen ve nişastanın yapıları, glukozu depolama işlevleri gibi, temel olarak benzerdir. Buna karşın, **sellüloz,** bitki hücresinin temel yapısal komponenti olmak gibi ayrı bir işleve sahiptir. Belki de şaşırtıcı olarak, sellüloz da tamamiyle glukoz moleküllerinden oluşmuştur. Ancak, sellülozda bulunan glukoz molekülleri α konfigürasyonda değil, β konfigürasyondadır ve de sellüloz dallanmamış bir polisakkariddir (Şekil 2.4). Glukoz kalıntılarının α(1→4) yerine β (1→4) bağlarıyla birleşmiş olması, sellülozun, uzun ve gerilmiş zincirler oluşturmasını olanaklı kılar ki bu da, büyük mekanik kuvvete sahip yan yana paketlenmiş lifleri şekillendirir.

Oligosakkarid ve polisakkaridler, enerji depolanması ve hücrenin yapısındaki işlevlerine ek olarak, çeşitli bilgiye



Şekil 2.3 Glikozidik bağın oluşumu
İki basit şeker, (bir molekül suyun çıkarıldığı) dehidrasyon reaksiyonu ile birleşirler. Verilen örnekte, α konfigürasyonundaki iki glukoz molekülü, 1. ve 4. karbon atomları arasında oluşan bağ ile birleşmiştir; bu bağ, α(1→4) glikozidik bağ adını alır.



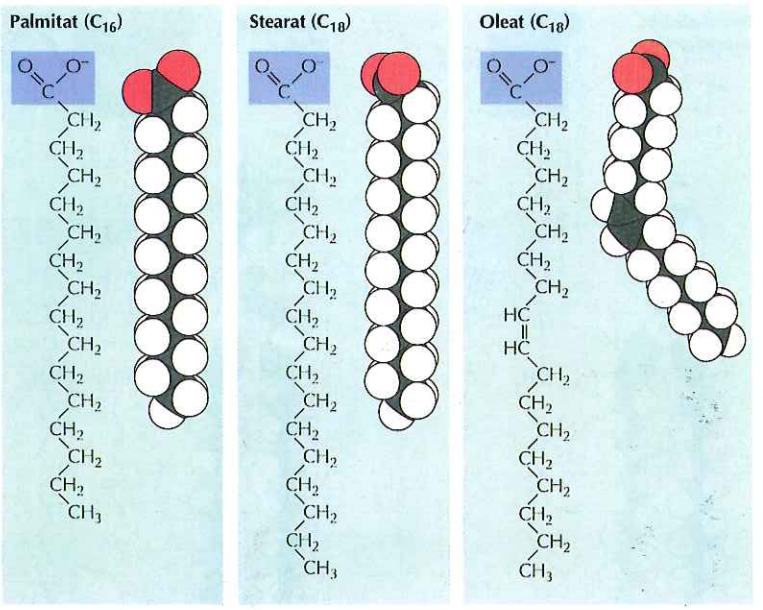
Şekil 2.4 Polisakkaridlerin yapısı
Polisakkaridler, yüzlerce veya binlerce basit şekerden oluşan makromoleküllerdir. Glikojen, nişasta ve sellüloz moleküllerinin tümü, tamamen glukoz birimlerinden oluşmuştur; glikojen ve nişastada, glukoz molekülleri α(1→4) glikozidik bağları ile, sellülozda ise β(1→4) glikozidik bağlarıyla bağlanmıştır. Glikojen ve nişastanın bir formu (amilopektin) ara ara, iki değişik α(1→4) zincirini dallanma noktalarında birleştiren α(1→6) glikozidik bağlarını da içerirler.

dayalı süreçlerde de önemlidirler. Örneğin, oligosakkaridler sıklıkla proteinlere bağlı olup protein katlanmasında önemli rolleri üstlenmelerinin yanı sıra, proteinlerin hücre yüzeyine hedeflenmlerinde ya da, değişik hücre altı organellere katılmalarında belirteç olarak işlev görürler. Oligosakkaridler ve polisakkaridler hücre yüzeyinde de belirteç görevini üstlenerek, hücre tanınmasında ve çok hücreli organizmaların dokularında hücreler arası etkileşimlerde önem taşırlar.

Lipidler

Lipidler, hücrelerde üç temel role sahiptir. Birincisi, önemli bir enerji depo formunu sağlamalarıdır. İkinci ve de hücre biyolojisi açısından son derece önem taşıyan rolleri, hücre zarlarının temel komponentlerini oluşturmalarıdır. Üçüncüsü de, lipidlerin hücre sinyal iletiminde, hem steroid hormonlar (östrojen ve testosteron gibi) hem de haberci moleküller olarak hücre yüzeyi reseptörlerinden hücre içindeki hedeflere sinyal taşımalarıdır.

En basit lipidler, uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşan ve bir ucunda karboksil grubunun (COO^-) bulunduğu, sıklıkla 16 veya 18 karbon içeren **yağ asitleridir** (Şekil 2.5). Doymamış yağ asitleri, karbon atomları arasında bir ya da daha fazla çift bağ içerir; doymuş yağ asitlerinde karbon atomlarının tümü maksimum sayıda hidrojen atomuna bağlıdır. Yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri yalnızca nonpolar C-H bağları içermektedir ki, bunlar su ile etkileşime giremezler. Bu yağ asitlerinin hidrofobik (sudan kaçan) doğası,

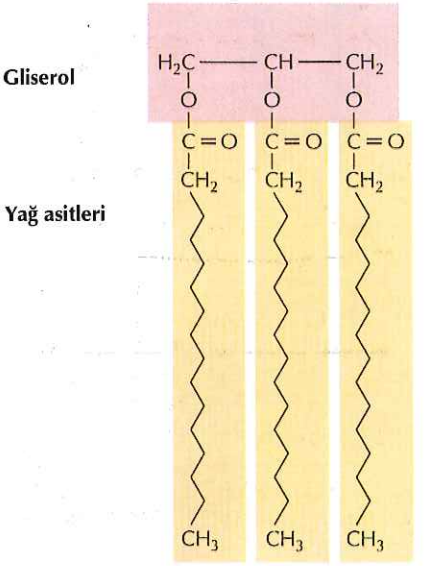


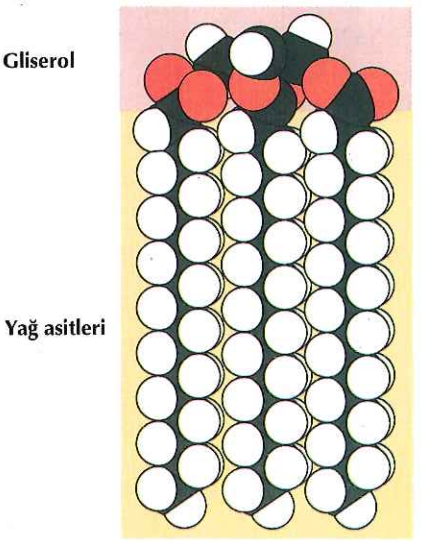
Şekil 2.5 Yağ asitlerinin yapısı
Yağ asitleri, karboksil grubu (COO^-) ile sonlanan uzun hidrokarbon zincirlerinden ibarettir. Palmitat ve stearat, sırasıyla, 16 ve 18 karbon içeren doymuş yağ asitleridir. Oleat, 9. ve 10. karbonlar arasında bir çift bağ içeren 18 karbonlu doymamış bir yağ asitidir. Çift bağın, hidrokarbon zincirinde bir bükülme oluşturduğuna dikkat ediniz.

karmaşık lipidlerin özellikle biyolojik zarları oluşturmak gibi birçok özelliğinden sorumludur.

Yağ asitleri **triaçilgliseroller (yağlar)** şeklinde depolanırlar; bu moleküller, bir gliserol molekülüne bağlı üç adet yağ asitinden oluşmuştur (Şekil 2.6). Triaçlgliseroller suda çözünmez ve dolayısıyla sitoplazmada yağ damlacıkları olarak birikir. Gerektiğinde bunlar yıkılıma uğrayarak bu bölümde daha sonra değinilecek olan enerji üreten tepkimelerde kullanılırlar. Yağların, karbohidratlara göre daha etkin enerji depolama formu olmaları kayda değerdir; yıkılan materyal ağırlığı başına iki katından fazla enerji verirler. Bu nedenle, yağlar, karbohidratlara göre, aynı enerjiyi, yarısından az bir vucüt ağırlığında depolama olanağı yaratırlar- bu da hayvanlar için, mobiliteleri nedeniyle, önemli bir değerlendirmedir.

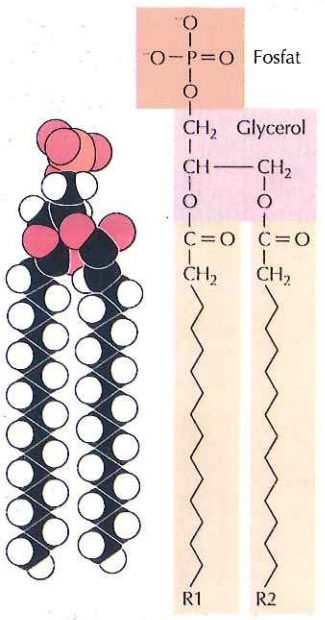
Hücre zarlarının temel komponentlerini oluşturan **fosfolipidler,** polar baş kısım ile birleşen iki yağ asitinden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Triaçilgliserolde olduğu gibi, gliserol fosfolipidlerinde, iki yağ asiti gliserolün karbon atomlarına bağlanır. Gliserolün üçüncü karbonu ise bir fosfat grubuna bağlıdır ki bu fosfat grubu da, sıklıkla, kolin, serin, inozitol veya etanolamin gibi küçük bir polar molekül ile birleşmiştir. Hücre zarlarının tek nongliserol fosfolipidi olan **sfingomyelin,** gliserol yerine serin'den oluşan bir polar baş kısma bağlanmış iki hidrokarbon zinciri içerir.Tüm fosfolipidler, iki hidrokarbon zincirinden oluşan hidrofobik kuyruk bölümleri ile, fosfat grubu ve polar bağlantılarından oluşan polar baş kısım içerirler. Sonuç olarak fosfolipidler **amfipatik** moleküllerdir: kısmen suda çözünen, kısmen de suda çözünmeyen özelliğe sahiptirler. Bu bölümde daha sonra görüleceği gibi, fosfolipidlerin bu özellikleri, biyolojik zarların yapılanmaları yönünden temel oluşturmaktadır.



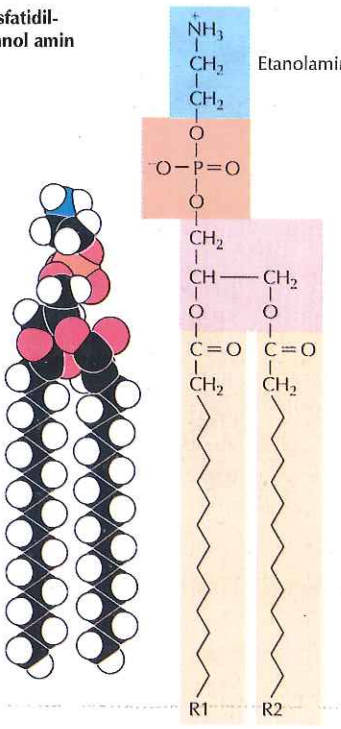


Şekil 2.6 Triaçilgliserollerin yapısı
Triaçilgliserolle r(yağlar) gliserole bağlanmış üç adet yağ asitini içerir. Bu örnekte, üç adet yağ asitinin tümü palmitattır; ancak, triaçilgliseroller sıklıkla, değişik yağ asiti karışımını içerirler.

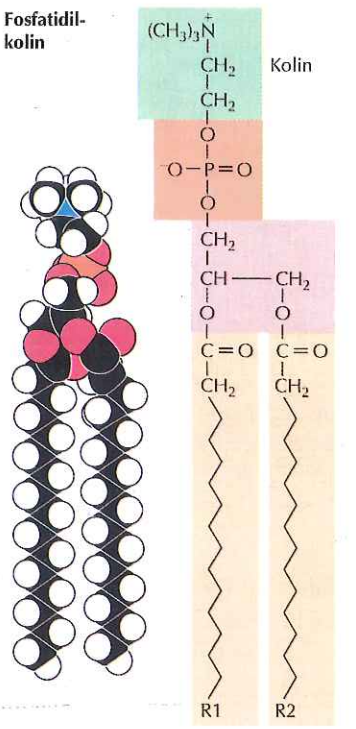
Fosfatidik asit



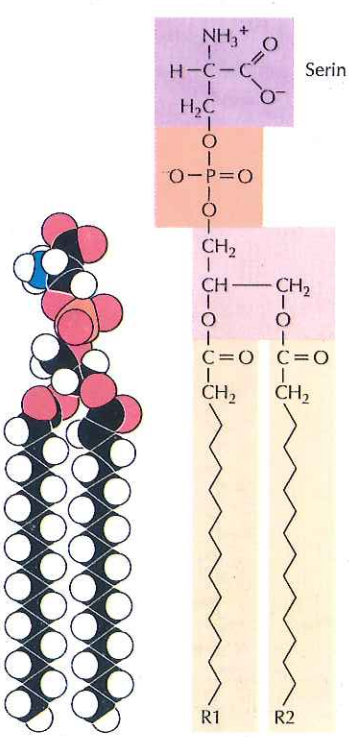
Fosfatidil-etanol amin



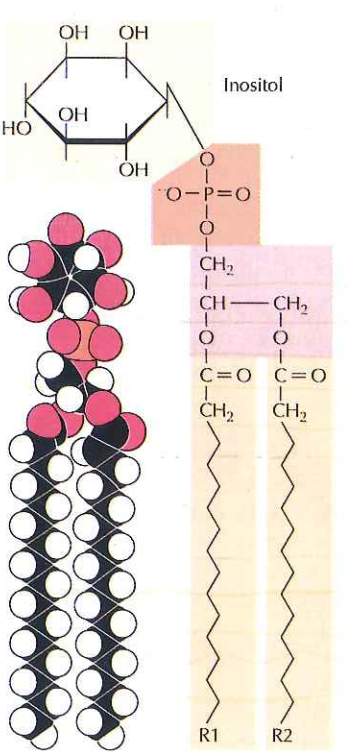
Fosfatidil-kolin



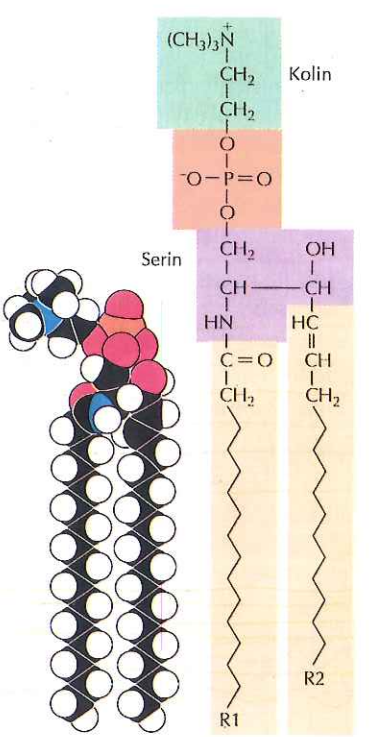
Fosfatidilserin



Fosfatidilinositol



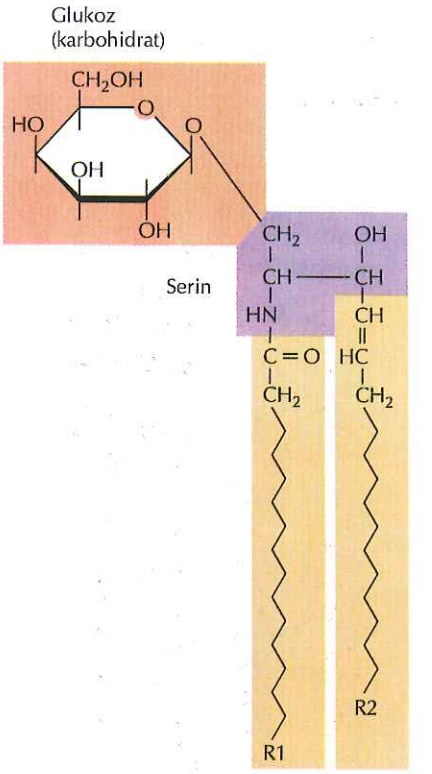
Sfingomiyelin



Şekil 2.7 Fosfolipidlerin yapısı
Gliserol fosfolipidleri gliserole bağlı iki adet yağ asiti içerir. Yağ asitleri, birbirinden farklı olabilir ve R1 ve R2 olarak belirtilmiştir. Gliserolün üçüncü karbonu bir fosfat grubu ile bağlanmıştır (fosfatidik asit oluşturur), ki bu da, sıklıkla, küçük bir polar molekül ile birleşir (etanolamin, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, veya fosfatidilinositol oluşur). Sfingomyelinde, iki adet hidrokarbon zinciri gliserol yerine serin'den oluşan bir polar baş kısma bağlanmıştır.

Fosfolipidlere ek olarak, birçok hücre zarı **glikolipid** ve **kolesterol** içerir. Glikolipidler karbohidrat içeren bir polar baş kısmına bağlanmış iki adet hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.8). Amfipatik moleküller olarak genel kompozisyonları açısından fosfolipidlere benzerler. Buna karşın kolesterol doğrusal hidrokarbon zincirleri yerine dört adet karbohidrat halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.9). Hidrokarbon halkalar kuvvetli hidrofobik özelliktedir; ancak, kolesterolün bir ucuna bağlanmış olan hidroksil (OH^-) grubu zayıf hidrofil karakterdedir; böylece, kolesterol amfipatiktir.

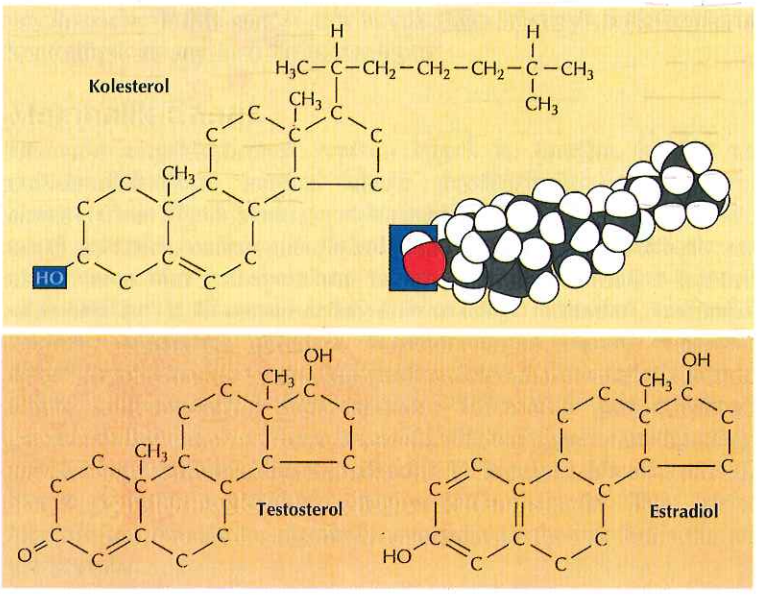
Hücre zarlarının komponentleri olma rollerine ek olarak lipidler, hem hücre içi, hem de hücreler arası sinyal molekülleri olarak da işlev görürler. **Steroid hormonlar** (östrojenler ve testosteron gibi) kolesterol türevleridir (bkz. Şekil 2.9). Bu hormonlar, belirli fonksiyonel grupların bağlandığı dört adet hidrokarbon halkası içeren, heterojen bir kimyasal haberci grubudur. Fosfolipidlerin türevleri de, hücre içinde, haberci moleküller olarak rol alırlar: sinyalleri, hücre yüzeyi reseptörlerinden, hücre proliferasyonu, hareketi, yaşamı ve diferansiyasyonu gibi geniş bir hücresel olay yelpazesini düzenleyen hücre içi hedeflere iletirler (bkz. Bölüm 13).



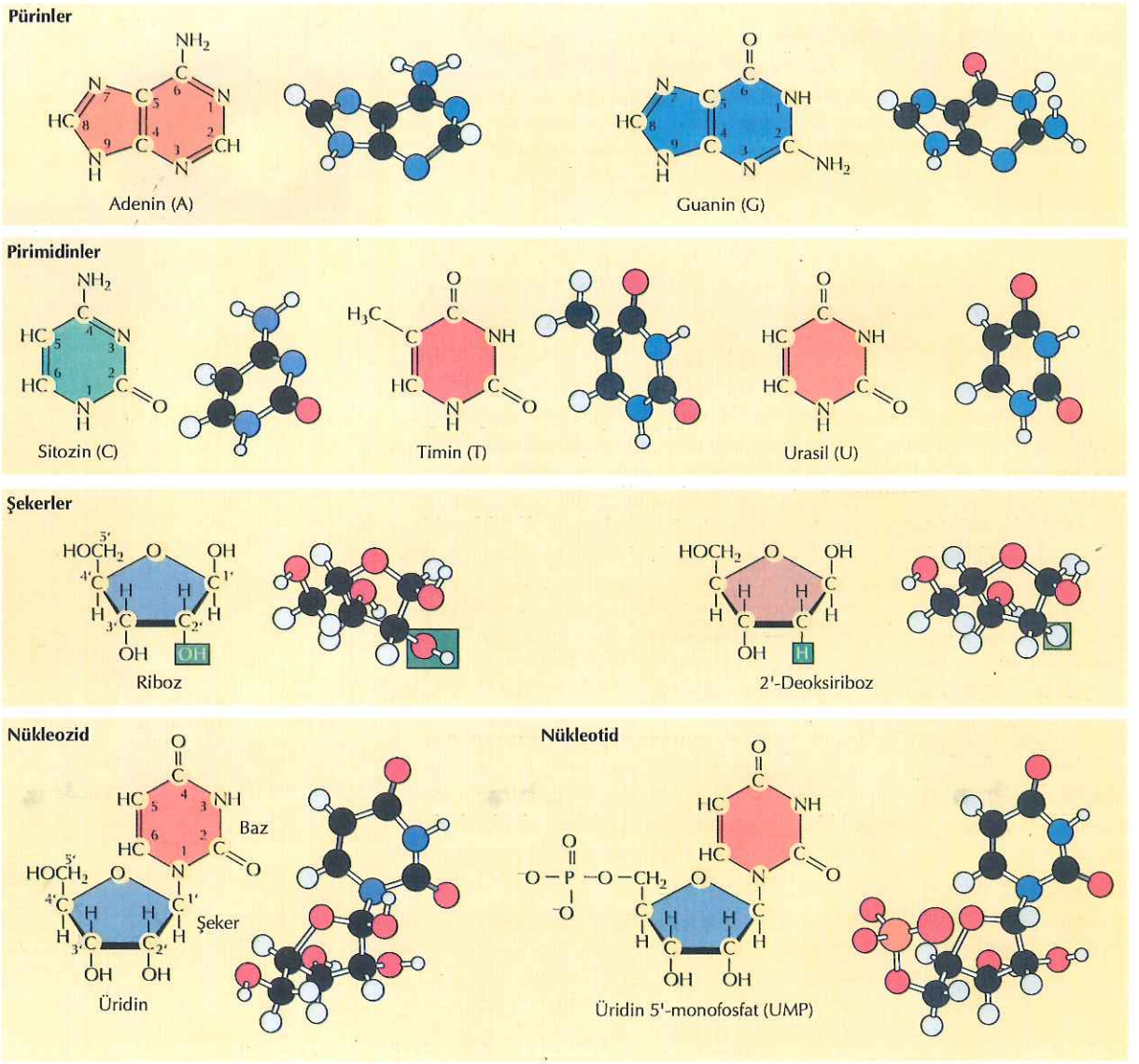
Şekil 2.8 Glikolipidlerin yapısı
Serinden oluşmuş ve karbohidrat içeren (örneğin, glukoz) polar baş grubuna, iki adet hidrokarbon zinciri bağlanmıştır.

Nükleik Asitler

Nükleik asitler -DNA ve RNA- hücrenin temel bilgi molekülleridir. **Deoksiribonükleik asit (DNA),** ökaryotik hücrelerde nükleusta yerleşim gösteren genetik materyalı oluşturma gibi özgün bir role



Şekil 2.9 Kolesterol ve steroid hormonlar
Önemli bir hücre zar komponenti olan kolesterol, polar hidroksil grubu nedeniyle amfipatik bir moleküldür. Kolesterol aynı zamanda, testosteron ve östradiol (bir östrojen türü) gibi steroid hormonların öncülüdür. Bu şekilde, halka karbonlarına bağlı olan hidrojen atomları gösterilmemiştir.

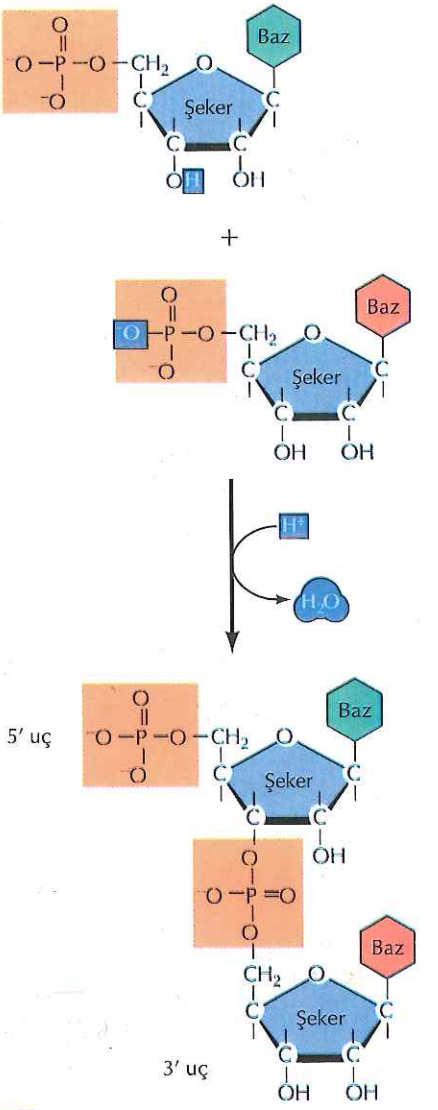


Şekil 2.10 Nükleik asitlerin bileşenleri
Nükleik asitler, fosforillenmiş şekerlere bağlı pürin ve pirimidin bazlarını içerirler. Nükleozid, yalnızca şeker molekülüne bağlı olan nükleik asit bazından oluşmaktadır. Nükleotidler, ek olarak, bir ya da daha fazla fosfat grubu içerirler.

sahiptir. Değişik **ribonükleik asit (RNA)** türleri de bir dizi hücresel etkinliğe katılmaktadır. **Mesajcı RNA (mRNA)** DNA'dan bilgiyi, protein sentezi için kalıp görevi yaptığı ribozomlara taşır. İki başka RNA türü (**ribozomal RNA** ve **transfer RNA**) protein sentezinde görevlidir. Başka RNA türleri de, hem RNA'ların, hem de proteinlerin işlemleme ve transportunda rol alır. Bilgi molekülü olmasına ek olarak, RNA bazı kimyasal tepkimeleri katalizleme yeteneğine sahiptir. Bugünkü hücrelerde, bu, hem protein sentezi hem de RNA işlenmesindeki tepkimeleri kapsar.

DNA ve RNA, **nükleotid** polimerleridir; nükleotidler, fosforillenmiş şekerlere bağlı pürin ve pirimidin bazlarından oluşmaktadır (Şekil 2.10). DNA iki adet pürin **(adenin ve guanin)** ve iki adet pirimidin **(sitozin ve timin)** içerir. Adenin, guanin ve sitozin RNA'da

Şekil 2.11 Nükleotidlerin polimerleşmesi
Bir nükleotidin 3' hidroksil grubu ile, bir diğer nükleotidin 5' fosfat grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşmaktadır. Bir polinükleotid zincirinin yönü vardır: bir uç 5' fosfat grubu ile (5'uç), diğer uç ise 3' hidroksil grubu ile (3' uç) sonlanmaktadır.



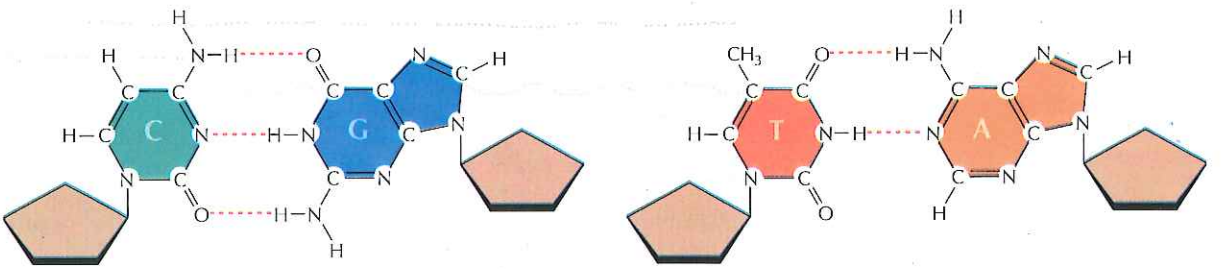
da bulunmaktadır, ancak RNA, timin yerine **urasil** içerir. Bazlar şekerlere (DNA'da 2'–**deoksiriboz**, ya da RNA'da, **riboz**) bağlanarak **nükleozidleri** oluştururlar. Nükleotidler buna ek olarak, nükleozid şekerlerin 5' karbonlarına bağlı bir ya da daha fazla fosfat grupları içerirler.

Nükleotidlerin nükleik asitleri oluşturmak üzere polimerleşmesi, bir nükleotidin 5' fosfatı ile, diğerinin 3'hidroksil grubu arasında **fosfodiester bağlarının** oluşumunu kapsar (Şekil 2.11). Oligonükleotidler, yalnızca birkaç nükleotid içeren küçük polimerlerdir; hücresel RNA ya da DNA'yı oluşturan büyük polinükleotidler, sırasıyla, binlerce ya da milyonlarca nükleotid içerirler. Kaydedilmesi gereken önemli bir nokta, polinükleotid zincirinin belirli bir yöne sahip olmasıdır; zincirin bir ucu 5' fosfat grubu ile, diğer ucu da 3' hidroksil grubu ile sonlanır. Polinükleotidler her zaman 5'-3' yönde sentezlenirler; büyüyen zincirin 3'OH grubuna serbest nükleotid eklenmektedir. Konvansiyonel olarak, DNA ya da RNA'da baz dizilimi 5'-3' yönünde belirtilir.

DNA ya da RNA'nın taşıdığı bilgi, polinükleotid zincirinde bazların sıralanışı ile taşınmaktadır. DNA, iki polinükleotid zincirinin ters yönlerde sıralandığı çift-sarmal bir moleküldür (bkz. Bölüm 3). Bazlar molekülün iç kısmında yerleşim gösterir ve de iki zincir, tamamlayıcı baz çiftleri arasında oluşan hidrojen bağları ile birleşirler: adenin timin ile, guanin de sitozin ile eşleşir (Şekil 2.12). Bu tür tamamlayıcı baz eşleşmesinin önemli bir sonucu, bir DNA (ya da RNA) sarmalının tamamlayıcı bir sarmalın sentezini yönlendirmek için kalıp görevini üstlenebilmesidir. Böylece, nükleik asitlerin, kendi kendilerini kopyalamayı yönlendirmek gibi özgün rolleri vardır ki, hücrenin temel bilgi molekülleri olarak davranırlar. DNA ve RNA tarafından taşınan bilgi, hücrenin etkinliklerinin çoğunluğunu kontrol eden spesifik proteinlerinin sentezini yönetir.

Nükleotidler, yalnızca nükleik asitlerin yapı taşı olarak önemli değillerdir; başka hücresel olaylarda da kritik roller üstlenirler. Belki de en önemli örnek, hücrenin kimyasal enerjisinin temel formu olan adenozin 5'-trifosfat (ATP) dır. Benzer olarak, diğer nükleotidler, ya

Şekil 2.12 Nükleik asit bazları arasında tamamlayıcı eşleşme
DNA'nın iki ipliği arasında hidrojen bağlarının oluşumu guanin'in (G) spesifik olarak sitozin (C) ile, adenin'in (A) ise spesifik olarak timin (T) ile eşleşmesine yol açar.



enerjiyi, ya da reaktif kimyasal grupları geniş bir metabolik tepkime yelpazesi içinde taşıma görevini üstlenirler. Ayrıca, bazı nükleotidler (örn., siklik AMP) hücrelerde önemli sinyal moleküllerdir (bkz. Bölüm 13).

Proteinler

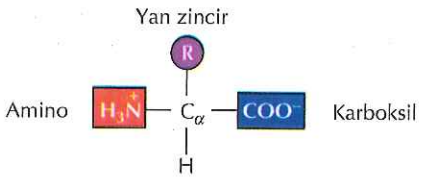
Proteinlerin temel sorumlulukları nükleik asitlerin taşıdığı genetik bilgi ile yönlendirilen işlerin yerine getirilmesidir. Proteinler, makromoleküller arasında en çok çeşitlilik gösterenlerdir ve her hücre, çok çeşitli görev yapan birkaç bin değişik protein içermektedir. Proteinlerin işlevleri arasında, hücrelerin ve dokuların yapısal bileşenlerini oluşturmak, küçük moleküllerin transport ve depolanmasında görev almak (örn., hemoglobin tarafından oksijen taşınması), hücreler arasında bilgi iletmek (örn., protein hormonlar), enfeksiyona karşı koruma (örn., antikorlar) oluşturmaktır. Ancak, proteinlerin en temel özellikleri, enzim olarak görev yapmaları olup, bir sonraki başlıkta ele alındığı gibi biyolojik sistemlerdeki hemen tüm tepkimeleri katalizlemektir. Böylece, proteinlerin, hücrenin hemen tüm etkinliklerini yönettikleri söylenebilir. Biyolojik kimyada proteinlerin temel önemi adlarından anlaşılmaktadır: Yunanca'da *proteios*, "birinci sıra" anlamındadır.

Proteinler, 20 değişik **amino asidin** polimerleridir. Her bir amino asit, bir karbon atomu (α karbon olarak adlandırılır) ve bağlı olduğu bir karboksil grubu (COO^-), bir amino grubu (NH_3^+), bir hidrojen atomu ve belirli bir yan grup içermektedir (Şekil 2.13). Değişik amino asit yan gruplarının spesifik kimyasal özellikleri, her bir amino asitin proteinin yapı ve işlevindeki rolünü saptar.

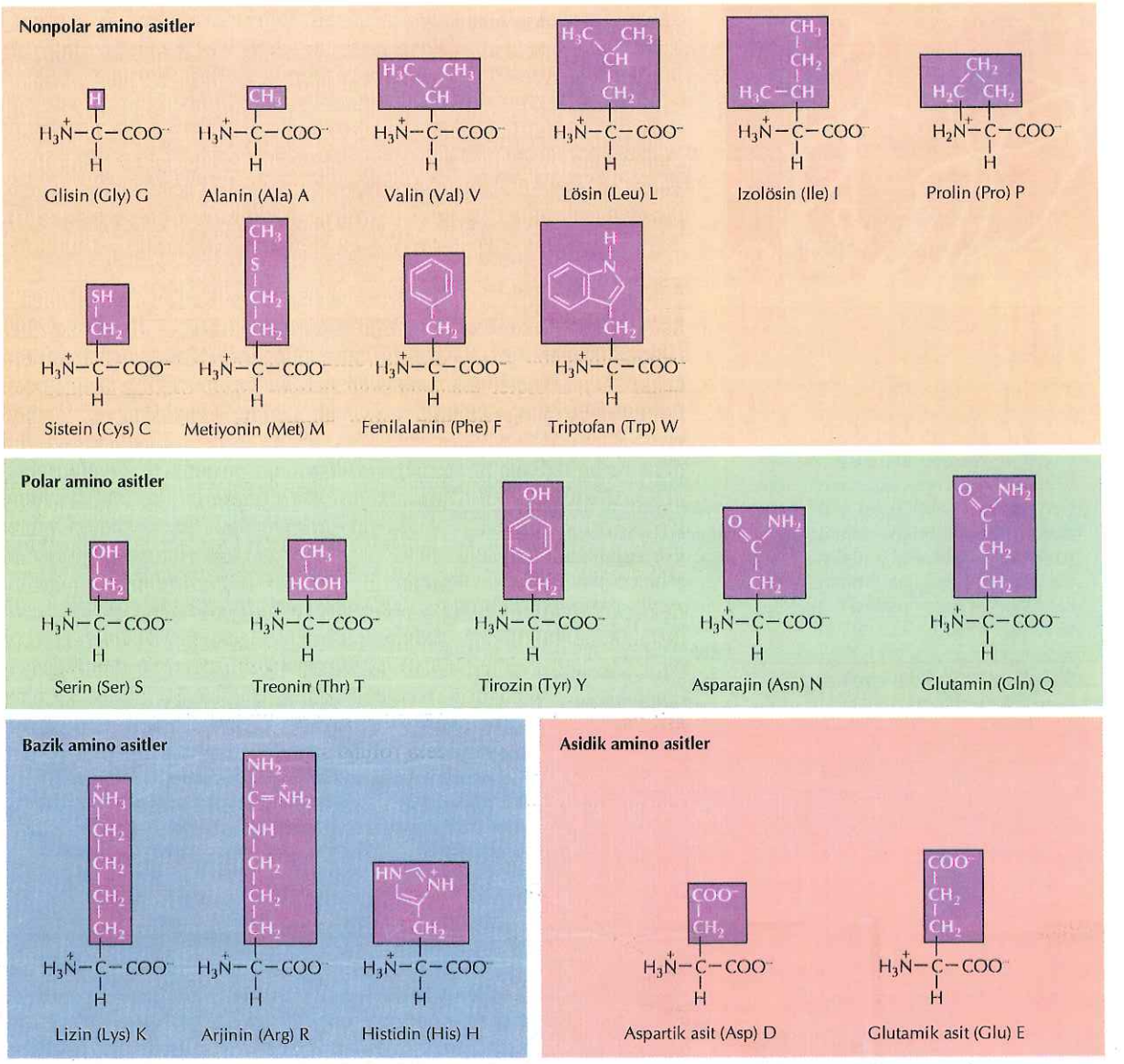
Amino asitler, yan gruplarının özelliklerine göre, dört geniş sınıf oluştururlar (Şekil 2.14). On amino asit, su ile etkileşime girmeyen nonpolar yan zincirleri içerirler. Glisin, yan grubu yalnızca bir hidrojen atomundan ibaret olan en basit amino asitdir. Alanin, valin, lösin ve izolösinde, dört karbon atomuna kadar hidrokarbon zinciri bulunmaktadır. Bu amino asitlerin yan grupları hidrofobik olup, proteinlerin, su ile temas etmeyecekleri iç bölgelerinde yer alma eğilimindedirler. Prolin de benzer olarak bir hidrokarbon zinciri içerir; ancak, yan zinciri amino grubun azotuna ve de α karbona bağlı olup halkasal bir yapı oluşturan tek amino asit olma özelliğindedir. İki amino asit, sistein ve metiyonin yan zincirleri kükürt atomu içermektedirler. Metiyonin oldukça hidrofobdur; ancak, sistein, sülfidril (SH) grubu nedeniyle, daha az hidrofobdur. Daha sonra tartışılacağı gibi, sisteinin sülfidril grubu protein yapısında önemli bir görev üstlenmektedir: değişik sistein birimlerinin yan grupları arasında disülfid bağları oluşabilmektedir. Son olarak, iki nonpolar amino asit, fenilalanin ve triptofan, kuvvetli hidrofobik aromatik halkalar içeren yan gruplara sahiptir.

Beş adet amino asit yüksüz fakat polar yan zincirler içerirler. Bunlar, yan zincirlerinde hidroksil grupları içeren serin, treonin, tirozin ile, polar amid grupları ($O=C-NH_2$) içeren asparajin ve glutaminden oluşmaktadır. Bu amino asitlerin polar yan zincirleri su ile hidrojen bağı oluşturabildiklerinden, bu amino asitler hidrofilik özelliktedir ve proteinlerin dış yüzeylerinde yerleşim gösterme eğilimindedirler.

Lizin, arjinin ve histidin amin asitleri yüklü bazik yan zincirler içerirler. Lizin ve arjinin son derece bazik özellikte amino asitlerdir; ve de yan zincirleri hücrede pozitif olarak yüklüdür. Dolayısıyla, kuvvetli hidrofilik özellikte olup proteinlerin yüzeylerinde su ile temas halinde



Şekil 2.13 Amino asitlerin yapısı
Her bir amino asit, merkezi bir karbon atomu (α karbon) ile bağlanmış bir adet hidrojen atomu, bir karboksil grubu, bir amino grubu ve de spesifik bir yan zincirden (R ile gösterilir) oluşur. Fizyolojik pH'da, gösterildiği gibi, hem karboksil, hem de amino grupları iyonize durumdadır.



Şekil 2.14 Amino asitler
Her bir amino asit için üç harfli ve bir harfli kısaltmalar gösterilmektedir. Amino asitler, yan zincirlerinin özelliklerine göre dört sınıfta toplanmıştır: nonpolar, polar, bazik ve asitik.

bulunurlar. Histidin, fizyolojik pH'da yüksüz ya da pozitif yüklü olarak bulunur; böylece, hidrojen iyonlarının değişimini kapsayan enzimatik tepkimelerde, bir sonraki başlık altında tartışılan enzimatik kataliz örneğinde görüleceği gibi, aktif rol oynarlar.

Son olarak, iki amino asit, aspartik asit ve glutamik asit, karboksil gruplarla sonlanan asitik yan zincirler taşırlar. Bu amino asitler hücre içinde negatif yüklü olup sıklıkla, aspartat ve glutamat olarak adlandırılırlar. Bazik amino asitler gibi, bunlar da kuvvetli hidrofiliktirler ve genellikle proteinlerin yüzeylerinde yerleşim gösterirler.

Amino asitler, bir amino asitin α amino grubu ile bir diğerinin α karboksil grubu arasında oluşan **peptid bağları** yoluyla birleşirler (Şekil 2.15). **Polipeptidler,** genelde yüzlerce ve hatta binlerce amino asitden oluşan doğrusal zincirlerdir. Her bir polipeptid zincirinin iki ayrı ucu bulunur: bir tanesi alfa amino grubu (amino, ya da N ucu), diğeri de karboksil grup (karboksil ya da C ucu) ile sonlanır.

ANAHTAR DENEY

Polipeptid Zincirlerinin Katlanması

Reductive Cleavage of Disulfide Bridges in Ribonuclease
Michael Sela, Frederick H. White, Jr., and Christian B. Anfinsen
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volum 125, 1957, pages 691-692.

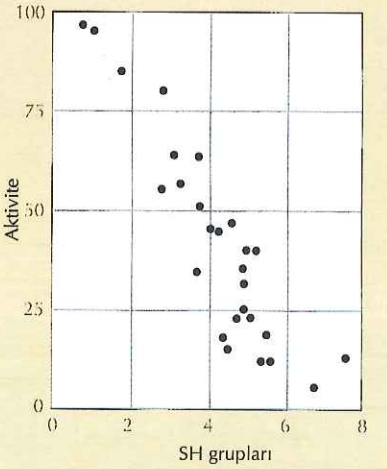
Bağlam

İşlevsel proteinler, yapısal olarak, amino asitlerin doğrusal zincirlerinden çok daha karmaşıktır. Aktif enzimlerin ya da diğer proteinlerin yapılanması, polipeptid zincirlerinin kesin olarak belirlenmiş üç-boyutlu konformasyonlara katlanmalarını gerektirir. Proteinler ile polipeptid zincirleri arasındaki bu farklılık protein yapı ve işlevinin anlaşılması yönünden kritik soruları ortaya çıkarır. Bir polipeptid tarafından kazanılabilecek çok sayıda konformasyonlardan uygun olanı nasıl seçilmektedir ve de, protein katlanmasını yönlendiren bilgi hangi özelliktedir?

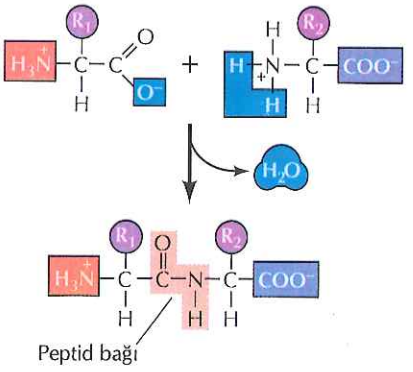
Christian Anfinsen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen klasik deneyler bu sorulara yanıt sağlamıştır. Ribonükleaz enzimini inceleyerek Anfinsen ve arkadaşları, denatüre proteinlerin, kendiliğinden, tekrar aktif bir konformasyona katlanabildiklerini göstermişlerdir. Dolayısıyla, bir proteinin doğru üç-boyutlu konformasyonunu belirleyecek olan tüm bilgi, proteinin birincil amino asit dizisinde saklıdır. Bu tür bir dizi deney, Anfinsen'i, bir proteinin natif üç-boyutlu yapısının, kendisini oluşturan amino asitler tarafından saptanan termodinamik yönden en kararlı konformasyona karşılık geldiği sonucuna götürmüştür. Bu son derece önemli ilkenin formülasyonuna götüren deneyler, 1957 yılında Anfinsen, Michael Sela ve Fred White tarafından rapor edilmiştir.

Deneyler

Sela, White ve Anfinsen tarafından üzerinde çalışılan protein, 124 amino asit içeren ve sistein birimleri arasında dört adet disülfid bağı (S-S) bulunan sığır ribonükleaz'ı idi. Ribonükleazın enzimatik etkinliği RNA'nın nükleotidlerine yıkılımına dayanan ve natif proteinin işlevinin ölçümü için uygun olan pratik bir yöntemle saptanabilmekteydi.



Renatürasyon deneylerinin sonuçlarının özeti. Grafikte y-ekseninde ribonükleazın enzimatik etkinliği, x-ekseninde değişik işlemler sonucunda saptanan sülfidril gruplarının sayısına karşı gösterilmiştir. Enzimatik etkinlik, natif enzimin arta kalan % etkinliği olarak ifade edilmiştir.



Şekil 2.15 Peptid bağının oluşumu
Bir amino asitin karboksil grubu, ikincisinin amino grubuna bağlanmaktadır.

Polipeptidler, amino ucundan, karboksil ucuna doğru sentezlenirler ve polipeptiddeki amino asitlerin dizilimi (geleneksel olarak) aynı sıra ile belirtilir.

Proteinlerin tanımlayıcı özelliği, spesifik amino asitlerden oluşan polipeptidler olmalarıdır. Frederick Sanger, 1953'de ilk olarak bir proteinin, insülin hormonunun tam dizilimini ortaya çıkarmıştır. İnsülinin, sistein birimleri arasında yer alan disülfid bağları ile birleşmiş iki adet polipeptid zincirinden oluştuğu bulunmuştur (Şekil 2.16). En önemlisi, Sanger'in deneyi şunu göstermiştir: her bir protein, spesifik bir amino asit dizilimini içermektedir. Günümüzde protein dizilimleri genellikle mRNA'ların diziliminden gidilerek aydınlatılmaktadır; ve de 100,000'in üzerinde proteinin amino asit dizilimi bulunmuş durumdadır. Her biri, bir gendeki nükleotidlerin sıralaması ile belirlenen özgün bir amino asit diziliminden oluşmaktadır (bkz. Bölüm 3).

Bir proteinin amino asit dizilimi, yapısının sadece bir komponentini oluşturur. Amino asitlerin uzanan zincirleri yerine, proteinler, işlevleri

Ribonükleaza, hem nonkovalent bağların (örn., hidrojen bağları) hem de disülfid bağlarının yıkılması (sülfidril gruplarına dönüştürmek suretiyle) ile sonuçlanan işlemler uygulandığında, enzimatik etkinlik tümüyle kaybolmuştur. Denatüre protein, rastgele bir inaktif konformasyona dönüşmüştür.

Sela, White ve Anfinsen şu önemli gözlemi kaydetmişlerdir: denatüre edilmiş protein, polipeptid zincirinin tekrar katlanabilmesi ve disülfid bağlarının tekrar oluşabilmesine olanak veren koşullarda inkübe edildiğinde, enzimatik etkinliğini geri kazanmaktadır. Bu deneylerde denatüran etkenler ortamdan uzaklaştırılmış ve inaktif enzim oda sıcaklığında O_2 içeren bir fizjolojik tampon çözelti içinde inkübe edilmiştir. Bu prosedür, sülfidril gruplarının yükseltgenmesine ve disülfid bağlarının tekrar oluşmasına yol açmıştır. Bu işlem sırasında enzim katalitik etkinliğini geri kazanmış olup bu, natif konformasyonuna katlandığını göstermiştir. Başka hücresel bileşenler ortamda bulunmadığından, uygun katlanma için gerekli tüm bilgilerin, polipeptid zincirinin primer amino asit dizilimde saklı olduğu ortaya çıkmıştır.

Etki

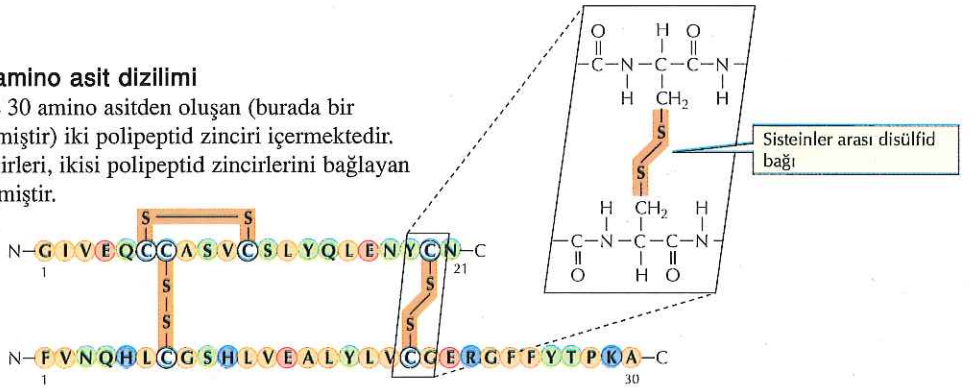
Denatüre edilmiş ribonükleazın natif yapısını ve enzimatik etkinliğini tekrar kazandığı koşulları tanımlayan daha başka deneyler gerçekleştirilmiş ve protein katlanmasının "termodinamik hipotezini" oluşturulmuştur: bir proteinin doğal üç-boyutlu yapısı fizyolojik koşullarda termodinamik olarak en kararlı duruma karşılık gelmektedir. Termodinamik kararlılık, proteini oluşturan amino asitlerin etkileşimleri ile saptanmaktadır; dolayısıyla, proteinlerin üç-boyutlu konformasyonları doğrudan primer amino asit dizilimleri ile belirlenmektedir. DNA'daki nükleotidlerin sıralanması bir polipeptidin amino asit dizilimini belirlediğinden, bir genin nükleotid dizilimin protein ürününün üç-boyutlu yapısını saptayan tüm bilgiyi içerdiği sonucu çıkmıştır.

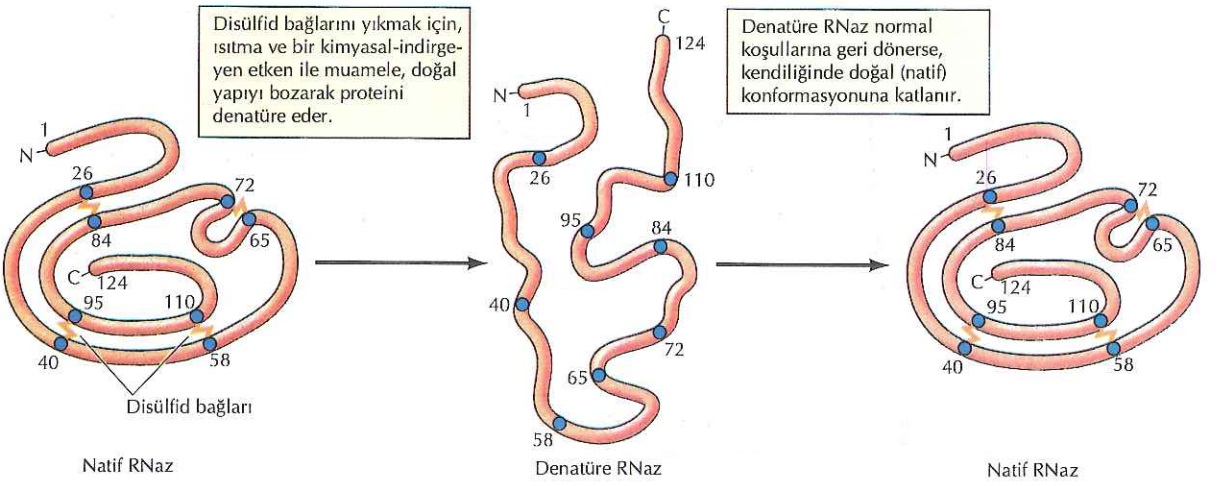
Anfinsen'in çalışmaları protein katlanmasının termodinamik temelini ortaya çıkarmışsa da, bu sürecin mekanizmasının anlaşılması aktif bir araştırma alanı olarak açıktır. Protein katlanması son derece karmaşıktır ve halen bir proteinin amino asit dizilimden yola çıkarak üç-boyutlu yapısını bulmak mümkün değildir. Şunu da göz ardı etmemek gerekir: bir proteinin in vitro olarak kendi kendine katlanması hücre içinde, enzimlerin yardımıyla, protein katlanmasından çok daha yavaştır (bkz. Bölüm 7). Protein katlanması problemi, biyolojik kimya alanında, araştırmaya açık önemli bir konu olarak sürmektedir.

Christian Anfinsen

için kritik olan, belirgin üç-boyutlu konformasyonlar almaktadırlar. Proteinlerin bu üç boyutlu konformasyonları, kendilerini oluşturan amino asitlerin etkileşimleri ile şekillenir; böylece, proteinlerin şekillerinin, içerdikleri amino asitlerle belirlendiği söylenir. Bu, ilk kez, Christian Anfinsen'in proteinlerin üç boyutlu yapılarının, ısıtmak gibi, non-kovalent bağların yıkıldığı ve denatürasyon adı verilen işlemlerle bozulduğu deneyler ile gösterilmiştir (Şekil 2.17). Daha hafif koşullarda inkübasyon gerçekleştirildiğinde, denatüre olmuş bu

Şekil 2.16 İnsülin'in amino asit dizilimi
İnsülin, biri 21, diğeri de 30 amino asitden oluşan (burada bir harfli kodlarıyla gösterilmiştir) iki polipeptid zinciri içermektedir. Üç çift sisteinin yan zincirleri, ikisi polipeptid zincirlerini bağlayan disülfid bağları ile birleşmiştir.





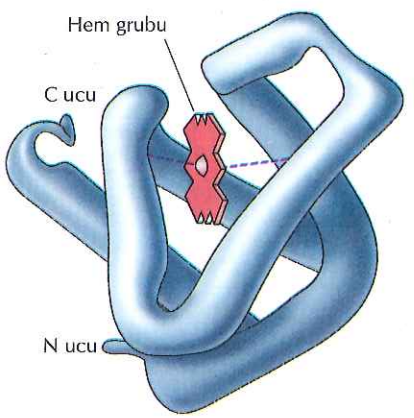
Şekil 2.17 Proteinlerin denatürasyon ve renatürasyonu
Ribonükleaz (RNaz) 124 amino asit (sayılar ile gösterilmiştir) den oluşan bir proteindir. Normalde protein, natif konfigürasyonunda, katlanmış durumda olup dört adet disülfid bağı (sistein kalıntılarını simgeleyen eşleşmiş halkalar ile gösterilmiştir) içermektedir.

proteinler, sıklıkla, spontan olarak renatürasyon ile natif konformasyonlarına geri dönmüşlerdir; bu da, bu konformasyonların doğrudan amino asit dizilimi ile belirlendiğini göstermektedir.

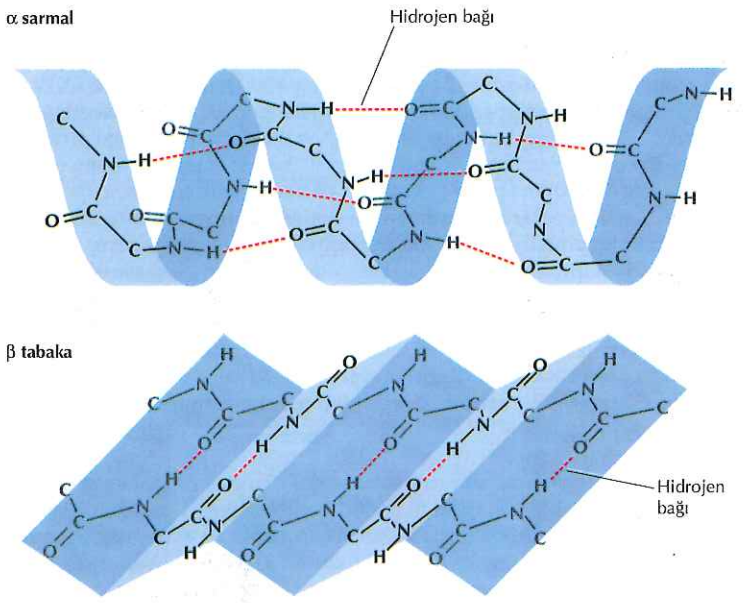
Proteinlerin üç-boyutlu yapıları, sıklıkla, yüksek-çözüm gücü olan ve bir moleküldeki tek tek atomların düzenini saptayabilen **X-ışınları kristallografisi** tekniği ile analiz edilmektedir. Analiz edilecek olan proteinin kristallerine, bir X-ışınları demeti yönlendirilmekte ve protein kristalinden geçen X ışınlarının paterni X-ışını filmi üzerinde kaydedilmektedir. X ışınları kristale çarptığında, moleküldeki atomların düzenine bağlı olarak karakteristik paternlerde saçılmaktadır. Dolayısıyla, molekülün yapısı saçılan X-ışınları (difraksiyon) paterninden elde edilebilmektedir.

John Kendrew 1958'de bir proteinin- 153 amino asitlik göreli basit bir protein, miyoglobinin- ilk kez üç-boyutlu yapısını saptayan kişi olmuştur (Şekil 2.18). O tarihten itibaren birkaç bin proteinin üç-boyutlu yapısı incelenmiştir. Çoğunluğu, miyoglobin gibi, polipeptid zincirlerinin kompakt yapılara katlanmış olduğu globüler proteinler olup, bazıları da (bağ dokularının yapısal proteinleri gibi) uzun, lifsel moleküllerdir. Protein yapılarının karmaşıklığının, üç-boyutlu yapılarının doğrudan amino asit diziliminden öngörülmesine olanak vermemesine karşın, bu proteinlerin üç-boyutlu yapılarının kristallografi ile incelenmesi, protein katlanmasında etken olan birçok temel ilkeyi ortaya çıkarmıştır.

Protein yapısı genelde dört düzeyde tanımlanmıştır. Bir proteinin **birincil yapısı** polipeptid zincirindeki amino asitlerin dizilimidir. İkincil yapı, polipeptidin helikal bölgelerinde amino asitlerin düzenli yerleşimidir. Linus Pauling ve Robert Corey tarafından 1951'de ilk kez önerilen iki tip **ikincil yapı, α sarmal** ve **β tabakalı** yapıdır. Her iki ikincil yapı örneği, peptid bağlarının CO ve NH grupları arasındaki hidrojen bağları ile ayakta durur. α sarmal, polipeptid zincirinin bir bölgesi kendi çevresinde döndüğünde, bir peptid bağının CO grubu ile,



Şekil 2.18 Miyoglobin'in üç-boyutlu yapısı
Miyoglobin, oksijen bağlaması ile ilişkili olup 153 amino asitten oluşan bir proteindir.Polipeptid zinciri, oksijen bağlama yüzeyi olarak işlev gören bir hem grubu çevresinde katlanmıştır.

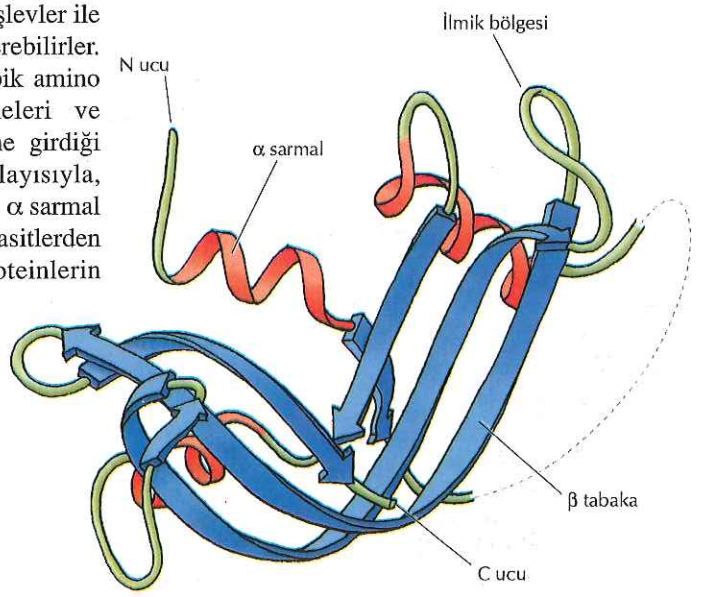


Şekil 2.19 Proteinlerin ikincil yapısı
En sık rastlanan ikincil yapı örnekleri, α sarmal ve β tabakalı yapılardır. Bir α sarmalda, dört adet amino asit birimi uzaklığında yerleşim gösteren iki peptid bağının CO ve NH grupları arasında hidrojen bağları kurulmaktadır. β tabakalı yapıda, hidrojen bağları, polipeptid zincirinin yan yana uzanan iki bölgesini birleştirmektedir. Amino asitlerin yan zincirleri gösterilmemiştir.

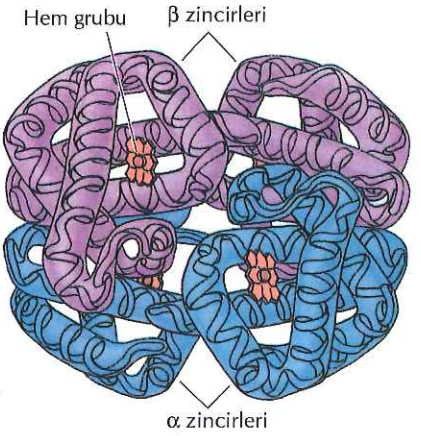
doğrusal polipeptid zincirinde dört adet amino asit birimi uzaklığında diğer bir peptid bağının NH grubu arasında bir hidrojen bağının oluşumu ile şekillenmektedir (Şekil 2.19). Buna karşın, bir β tabakası, bir polipeptid zincirinin iki bölümü, aralarında hidrojen bağları ile, yan yana dizildiğinde şekillenmektedir. Bu tür β tabakalar, birbirine paralel ya da antiparalel olarak dizilen çok sayıda polipeptid zincirleri arasında da oluşabilir.

Üçüncül yapı, polipeptidin primer yapısının değişik bölgelerindeki amino asitlerin yan zincirlerinin birbirleri ile etkileşimi sonucunda (Şekil 2.20) katlanması ile oluşur. Proteinlerin çoğunluğunda, "ilmik" bölgesinde birleşen α sarmal ve β tabakalı yapılarının değişik kombinasyonları domeyn (etkin bölge) adı verilen kompakt globüler yapılara katlanırlar ki domeynler, tersiyer yapının temel birimleridir. Ribonükleaz ya da miyoglobin gibi küçük proteinler tek bir bölgeyi içerirler; daha büyük proteinler, sıklıkla belirli işlevler ile ilişkili olan, belirli sayıda değişik domeynler içerebilirler.

Üçüncül yapının kritik bir özelliği, hidrofobik amino asitlerin proteinin iç bölümünde yerleşmeleri ve hidrofilik amino asitlerin de, su ile etkileşime girdiği yüzey bölümünde lokalize olmalarıdır. Dolayısıyla, katlanmış proteinlerin iç bölümleri temel olarak, α sarmal ve β tabakasal yapı gösteren hidrofibik amino asitlerden oluşmaktadır; bu sekonder yapıların proteinlerin hidrofobik kor bölümlerinde bulunmaları,



Şekil 2.20 Ribonükleaz'ın üçüncül yapısı
İlmik bölgeleri ile bağlanmış olan α sarmal ve β tabakalı ikincil yapıların bazı bölgeleri, proteinin natif konformasyonunu oluşturmak üzere katlanmıştır. Polipeptid zincirinin kurdele modeli olarak gösterildiği bu şematik gösterimde, α sarmallar helezon olarak, ve β tabakalar da geniş oklar olarak simgelenmiştir.



Şekil 2.21 Hemoglobin'in kuarterner yapısı
Hemoglobin, her biri bir hem grubuna bağlı dört adet polipeptid zincirinden oluşmuştur. İki α zincir ile iki β zincir idantiktir.

hidrojen bağlarının, polipeptid omurgasının CO ve NH gruplarının polar karakterini nötralize etmesindendir. İkincil yapının elemanlarını birleştiren ilmik bölgeleri ise, katlanmış proteinlerin yüzey bölümlerinde yer almakta ve peptid bağlarının polar bileşenleri, su ile ya da hidrofilik amino asitlerin polar yan zincirleri ile hidrojen bağları oluşturmaktadır. Proteinin yüzeyinde, polar amino asitlerin yan zincirleri arasındaki etkileşimler (hidrojen bağları ve iyonik bağlar) de üçüncül yapının önemli belirleyicileri arasındadır. Bunlara ek olarak, sisteinlerin sülfidril grupları arasındaki kovalent disülfid bağları da, birçok hücre-yüzeyi veya salgılanan proteinin katlanmış yapılarını stabilize ederler.

Protein yapısının dördüncü düzeyi, **kuarterner yapı,** birden fazla polipeptid zincirinden oluşmuş proteinlerde değişik polipeptid zincirleri arasındaki etkileşimlerle şekillenir. Örneğin, hemoglobin, üçüncül yapısını oluşturan türde etkilişimlerle bir arada tutulan dört adet polipeptid zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.21).

Yirmi değişik amino asitin özgün kimyasal özellikleri katlanmış proteinlerin üç-boyutlu yapılarında önemli ölçüde çeşitliliğe yol açmaktadır. Dolayısıyla, proteinler, hücrede biyolojisinde gerçekleştirdikleri geniş işlev yelpazesine uygun olarak, son derece karmaşık ve çeşitli bir makromolekül grubunu oluşturmaktadır.

Enzimlerin Biyolojik Katalizörler Olarak Merkezi Rolleri

Proteinlerin temel bir görevi, enzim olarak işlev yapmaktır- enzimler, hücrelerdeki hemen tüm kimyasal reaksiyonların hızını artırırlar. Her nekadar RNA'lar bazı reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahipseler de, biyolojik reaksiyonların çoğunluğu proteinler tarafından katalizlenirler. Enzimatik kataliz yokluğunda, biyokimyasal reaksiyonların çoğu o kadar yavaş işler ki, yaşam ile bağdaşan sıcaklık ve basınç koşullarında gerçekleşmeleri olanaksızdır. Enzimler reaksiyonların hızlarını milyon katından daha fazla hızlandırırlar; kataliz yokluğunda yıllar sürecek reaksiyonlar, uygun enzim ile katalizlendiğinde, saniyenin fraksiyonları içinde gerçekleşebilir. Hücreler binlerce değişik enzim içerirler ve enzimlerin etkinlikleri hücrede, birçok reaksiyondan hangilerinin gerçekleşeceğini belirler.

Enzimlerin Katalitik Etkinliği

Tüm diğer katalizörlerde olduğu gibi, enzimler de iki temel özellik gösterirler. Birincisi, kimyasal reaksiyonların hızını, kendileri tüketilmeden ya da kalıcı bir değişikliğe uğramadan arttırırlar. İkincisi, reaksiyon hızlarını, reaktantlar ve ürünler arasındaki kimyasal dengeyi değiştirmeksizin artırırlar.

Enzimatik katalizin bu ilkeleri aşağıdaki örnekte sergilenmektedir: sübstrat [S], olarak tanımlanan bir molekül, reaksiyon sonucunda, ürüne [Ü] dönüştürülmektedir. Enzimin yokluğunda reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$S \rightleftarrows Ü$$

S ile Ü arasındaki kimyasal denge termodinamik yasalara göre saptanır (bu bölümde daha ilerki bir alt başlıkta tartışılacaktır) ve de, ileri ve geri reaksiyon hızlarının oranı ile temsil edilir (Sırasıyla, S→ Ü ve Ü→S). Uygun enzimin varlığında, S'in Ü'e dönüşümü hızlandırılır, ancak S ve Ü arasındaki denge değişmez. Bu nedenle,

enzim, hem ileriye, hem de geriye doğru eşit olarak hızlandırmalıdır. Reaksiyon, aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$S \overset{E}{\rightleftarrows} Ü$$

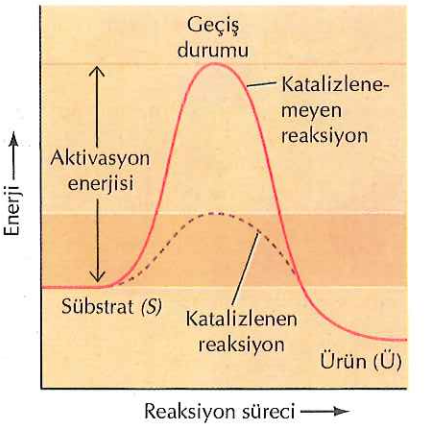
Enzimin (E) reaksiyonla değişime uğramadığına, böylece, S ve Ü'nün termodinamik özellikleri ile saptanan dengenin değişmediğine dikkat ediniz.

Böyle bir reaksiyona enzimin etkisi, S'ın Ü'e dönüşümü (Şekil 2.22) sırasında oluşması gereken enerji değişiklikleri ile, en iyi şekilde, gösterilebilir. Reaksiyonun dengesi, S ve Ü'nün, enzimatik kataliz ile değişmeyen, son enerji durumları ile saptanmaktadır. Ancak, reaksiyonun ilerlemesi için, sübstrat önce, **tranzisyon (geçiş) durumu** adı verilen daha yüksek bir enerji durumuna dönüştürülmelidir. Tranzisyon durumuna geçiş için gerekli enerji (**aktivasyon enerjisi**) reaksiyon ilerlemesine bir bariyer oluşturarak, reaksiyon hızını sınırlandırır. Enzimler (ve diğer katalizörler) aktivasyon enerjisini düşürerek ve böylece reaksiyonun hızını artırarak etki ederler. Artmış hız, hem ileri, hem de geri reaksiyonlarda aynıdır zira her ikisi de aynı geçiş durumundan geçmek zorundadır.

Enzimlerin katalitik etkinlikleri, sübstratlarının, enzim-sübstrat kompleksi (*ES*) oluşturmak üzere bağlanmalarını içerir. Sübstrat, enzimin, **aktif bölge** olarak tanımlanan özgün bir bölgesine bağlanır. Aktif yüzeye bağlı durumda iken, sübstrat, reaksiyon ürününe dönüştürülerek enzimden serbestleştirilir. Enzim ile katalizlenen bir reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$S + E \rightleftarrows ES \rightleftarrows E + Ü$$

Denklemin heriki tarafında da E'nin değişmediğne ve dolayısıyla dengenin etkilenmediğine dikkat ediniz. Ancak, enzim, S'ı Ü'e dönüştüren reaksiyonların rahatça oluşabileceği bir yüzey sağlamaktadır. Bu, enzim ile sübstrat arasındaki, aktivasyon enerjisini düşüren ve geçiş durumunu destekleyen etkileşimlerin sonucudur.



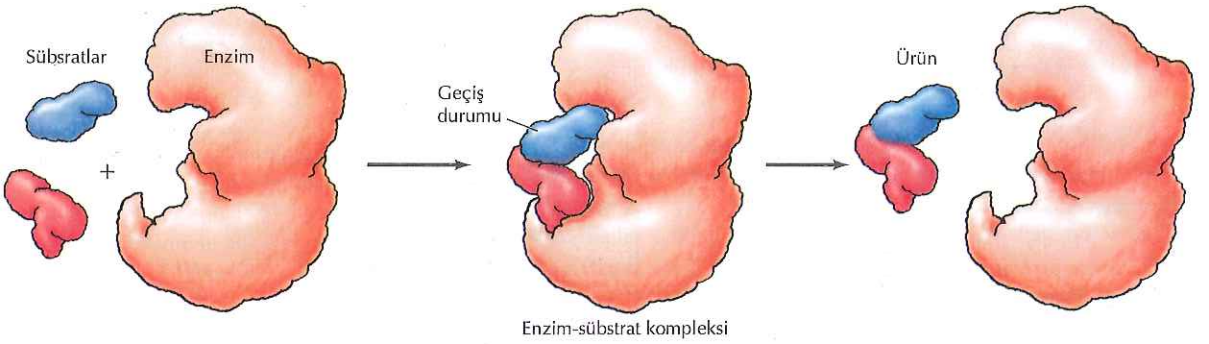
Şekil 2.22 Katalizlenen ve katalizlenmeyen reaksiyonların enerji diyagramları
Gösterilen reaksiyon, S sübstratının P ürününe basitçe dönüşümüdür. P'nin son enerji durumu S'ınkinden daha düşük olduğundan, reaksiyon soldan sağa doğru ilerler. Ancak, reaksiyonun oluşabilmesi için, S'ın öncelikle daha yüksek enerjili bir geçiş durumundan geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş durumuna erişmek için gereken enerji (aktivasyon enerjisi) reaksiyonun ilerlemesine bir bariyer oluşturur ve dolayısıyla reaksiyonun ilerleme hızını saptar. Katalizör varlığında (örn., bir enzim) aktivasyon enerjisi düşürülmekte ve reaksiyon artmış hızda ilerlemektedir.

Enzimatik Kataliz Mekanizmaları

Bir sübstratın enzimin aktif bölgesine bağlanması çok spesifik bir etkileşimdir. Aktif bölgeler, enzimlerin yüzeyinde, genelde, katlanmış proteinin üçüncül yapısında bir arada tutulan değişik bölgelerin amino asitlerinden oluşan yarık ya da oluklardır. Sübstratlar, önce, aktif bölgeye, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik etkileşimler gibi nonkovalent etkileşimlerle bağlanırlar. Sübstrat enzimin aktif bölgesine bağlandıktan sonra, reaksiyon ürününe dönüşümünü çok sayıda mekanizma hızlandırabilir.

Her ne kadar bir önceki alt-başlıkta tartışılan basit örnek tek bir sübstrat molekülünü kapsamakta ise de, biyokimyasal reaksiyonların çoğunluğunda, iki ya da daha fazla sübstrat arasındaki etkilişimler söz konusudur. Örneğin, bir peptid bağın oluşumu iki amino asitin birleşmesini gerektirir. Bu tür reaksiyonlarda, iki ya da daha fazla sübstratın aktif bölgeye, uygun pozisyonda ve yönlenme ile bağlanması, reaksiyonu hızlandırır (Şekil 2.23). Enzim, reaktantların biraraya getirildiği ve reaksiyona girdikleri, geçiş durumuna girmelerini uygun şekilde yönlendirildiği bir kalıp sağlamaktadır.

Enzimler aynı zamanda sübstratlarının konformasyonlarını, geçiş durumuna yaklaştırmak açısından, değiştirmek şeklinde de reaksiyonları hızlandırabilirler. Enzim sübstrat birleşmesinde en basit



Şekil 2.23 İki sübstrat arasındaki reaksiyonun enzimatik katalizi
Enzim, iki sübstratın uygun pozisyonda ve yönlenmede biraraya getirileceği bir kalıp sağlamaktadır.

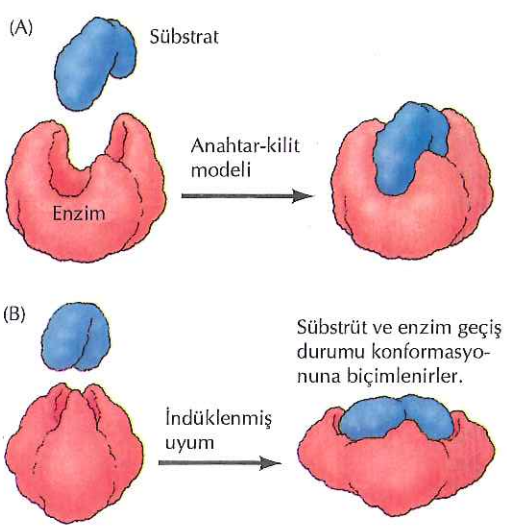
model, **anahtar-kilit modeli** olup, sübstratlar aktif yüzeye tam olarak uyarlar (Şekil 2.24). Ancak, birçok durumda, hem enzimin, hem de sübstratın konfigürasyonları sübstratın bağlanması ile değişir- bu olaya **indüklenmiş uyum** adı verilir. Bu durumlarda, sübstratın konformasyonu geçiş durumuna daha çok benzeyecek şekilde değiştirilmektedir. Sübstratın bu şekilde bozulmasından doğan stres, kritik bağları zayıflatmak suretiyle, geçiş durumuna geçişini kolaylaştırabilir. Ayrıca, geçiş durumu, sübstratın enzime sıkıca bağlanması ile stabilize olmakta ve böylece, gereken aktivasyon enerjisi düşürülmektedir.

Çok sayıda sübstratı bir araya getirmek ve sübstratların konformasyonlarını, geçiş durumuna yaklaştırmak üzere değiştirmenin yanı sıra, birçok enzim katalitik sürece doğrudan katılır. Bu durumda, aktif yüzeydeki spesifik amino asitler sübstrat ile reaksiyona girerek reaksiyon ara ürünleri arasında bağlar oluşturabilir. Bu katalitik mekanizmalarda, aşağıda enzimatik kataliz örneği olarak tartışılan kimotripsinde olduğu gibi, genellikle asidik ve bazik amino asitler yer almaktadır.

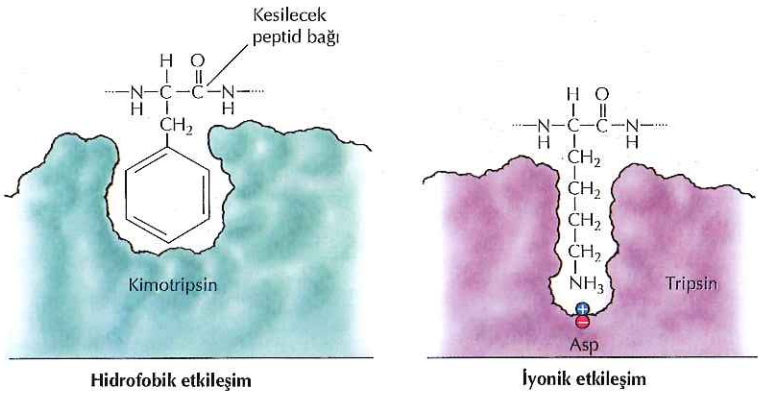
Kimotripsin proteinleri peptid bağlarının hidrolizini kataliz ederek sindiren enzim ailesinin (serin proteazlar) bir üyesidir. Reaksiyon aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\text{Protein} + H_2O \rightarrow \text{Peptid}_1 + \text{peptid}_2$$

Serin proteazlar ailesinin değişik üyeleri (kimotripsin, tripsin, elastaz ve trombin dahil olmak üzere) sübstrat özgüllüğüne sahiptirler; belirli amino asitlere komşu olan peptid bağlarını yıkılıma uğratırlar. Örneğin, kimotripsin, triptofan ve fenilalanin gibi hidrofobik amino asitlere komşu olan bağları sindirirken, tripsin, lizin ve arjinin gibi bazik amino asitlere komşu olan bağları sindirmektedir. Tüm serin proteazlar yapı olarak benzer olup aynı kataliz mekanizmasını kullanırlar. Bu enzimlerin aktif yüzeyleri, peptid bağın hidrolizini sürükleyen üç kritik amino asit içerir- serin, histidin ve aspartat. Bu enzimlere "serin proteazlar" denmesinin nedeni, serin amino asitlerinin merkezi rolüdür.



Şekil 2.24 Enzim-sübstrat etkileşimi modelleri
(A) Anahtar-kilit modelinde, sübstrat, enzimin aktif yüzeyine tam olarak uymaktadır. (B) İndüklenmiş uyum modelinde, sübstratın bağlanması ile hem enzimin hem de sübstratın konformasyonları bozulmaktadır. Bu değişiklik, sübstratı geçiş durumunun konformasyonuna yaklaştırmakta ve böylece reaksiyonu hızlandırmaktadır.



Şekil 2.25 Serin proteazlar tarafından sübstrat bağlanması
Yıkılacak peptid bağına komşu olan amino asit enzimin aktif yüzeyinde bulunan bir cebe yerleştirilir. Kimotripsinde bu cep hidrofobik amino asitleri bağlamaktadır; tripsinin bağlama cebi ise, iyonik etkileşimlerle bazik amino asitleri bağlayan negatif yüklü aspartatları içermektedir.

Sübstratlar, serin proteazlara, yıkılım bölgelerine komşu olan amino asitin enzimin aktif yüzeyindeki cebe girmesi ile bağlanırlar (Şekil 2.25). Bu cebin doğası serin proteaz ailesinin değişik üyelerinin sübstrat özgüllüklerini saptar. Örneğin, kimotripsinin bağlama cebi, tercih ettiği sübstratlarının hidrofobik yan zincirleri ile etkileşime girebilecek olan hidrofobik amino asitleri kapsar. Buna karşın, tripsinin bağlama cebinde, sübstratlarının lizin ya da arjinin amino asitleri ile iyonik bağ oluşturabilecek olan negatif yüklü asidik bir amino asit (aspartat) yer alır.

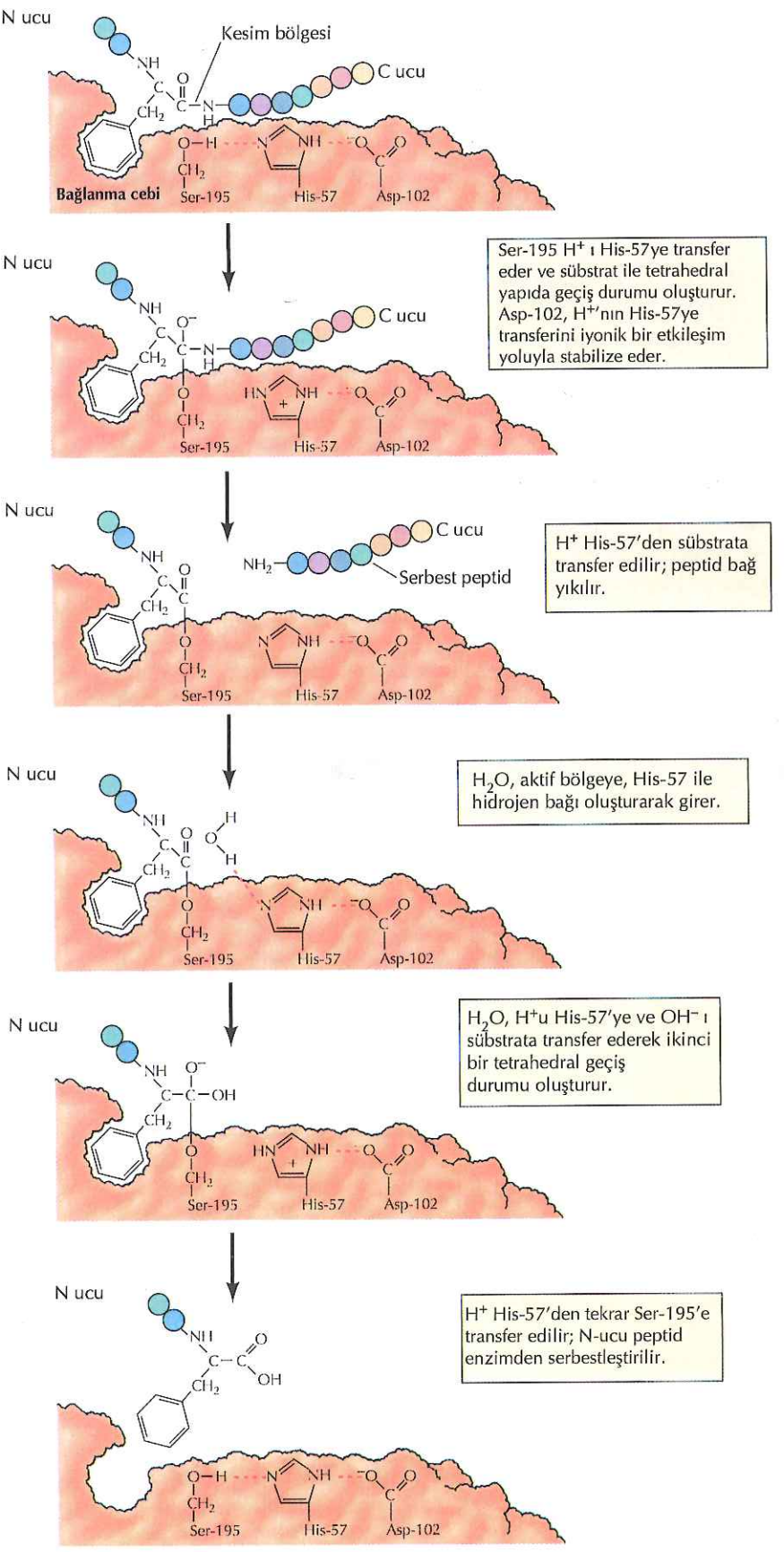
Sübstrat bağlanması, yıkılıma uğratılacak olan peptid bağını aktif yüzeydeki serin amino asitine komşu pozisyonda yerleştirir (Şekil 2.26). Daha sonra, serinin protonu aktif yüzeydeki histidine transfer edilir. Aktif yüzeyin konformasyonu, bu transferi destekler niteliktedir çünkü histidin, nagatif yüklü aspartat ile etkileşime girmektedir. Serin, sübstratla reaksiyona girerek tetrahedral bir geçiş durumu oluşturur. Daha sonra, peptid bağı yıkılır ve sübstratın C-ucu enzimden ayrılır. Ancak, N-ucu serine bağlı olarak kalır. Bu durum, bir su molekülünün (ikinci sübstrat) aktif yüzeye girerek önceki reaksiyonları tersine çevirmesi ile çözümlenir. Su molekülünün protonu histidine taşınır; peptid enzimden serbrestleştirilir ve reaksiyon sonlanır.

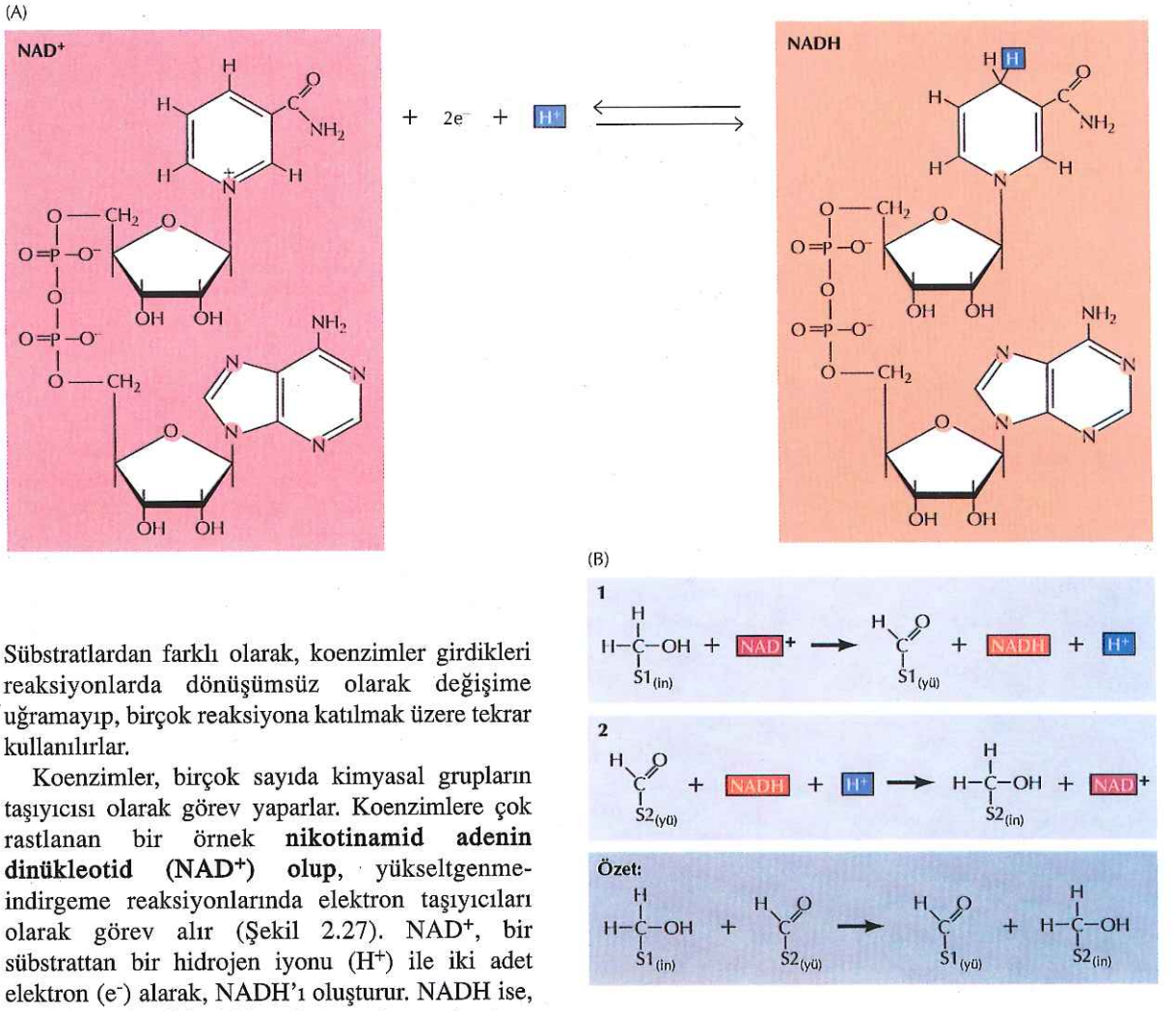
Bu örnek, enzimatik katalizin birçok yönünü sergilemektedir: enzim-sübstrat reaksiyonlarının özgüllüğü, değişik sübstrat moleküllerinin aktif bölgeye yerleşimi, geçiş durumunun oluşmasında ve stabilizasyonunda, aktif-bölgedeki amino asitlerin rolü. Her nekadar hücrelerde binlerce enzim çok değişik türde kimyasal reaksiyon katalizliyorsa da, aynı temel ilkeler bunların işleyişinde de geçerli olmaktadır.

Koenzimler

Enzimlerin aktif bölgeleri, sübstratlarını bağlamalarının yanı sıra, katalize katılan başka küçük molekülleri de bağlarlar. **Prostetik gruplar**, proteinlere bağlı olup kritik fonksiyonel roller üstlenen küçük moleküllerdir. Örneğin, miyoglobin ve hemoglobin tarafından taşınan oksijen, bu proteinlerin prostetik grubu olan heme bağlanır. Birçok durumlarda metal iyonları (çinko ya da demir) enzimlere bağlı olup katalitik süreçlerde önemli role sahiptir. Buna ek olarak, birçok düşük molekül ağırlıklı organik moleküller belirli tip enzimatik reaksiyonda görev alırlar. Bu moleküllere **koenzimler** adı verilir çünkü enzimlerle birlikte, reaksiyon hızlarını artırmak için çalışırlar.

Şekil 2.26 Kimotripsinin katalitik mekanizması
Aktif yüzeyde yer alan üç amino asit (Ser-195, His57 ve Asp-102) katalizde kritik rol üstlenirler.





Şekil 2.27 Yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında NAD⁺'nin rolü
(A) Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) elektronları alarak NADH oluşturmak suretiyle, yüksektgeme-indirgeme reaksiyonlarında elektron taşıyıcısı olarak işlev yapmaktadır. (B) Örneğin, NAD^+ elektronları S1den alarak, yükseltgenmiş S1 ve NADH oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda oluşan NADH daha sonra elektronlarını ikinci bir sübstrata (S2) transfer ederek indirgenmiş S2 oluşturmakta ve NAD^+ rejenere edilmektedir. Net etki, (NADH) tarafından, elektronların S1den (yükseltgenir) S2 ye (indirgenir) taşınmasıdır.

Sübstratlardan farklı olarak, koenzimler girdikleri reaksiyonlarda dönüşümsüz olarak değişime uğramayıp, birçok reaksiyona katılmak üzere tekrar kullanılırlar.

Koenzimler, birçok sayıda kimyasal grupların taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimlere çok rastlanan bir örnek **nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) olup**, yükseltgenme-indirgeme reaksiyonlarında elektron taşıyıcıları olarak görev alır (Şekil 2.27). NAD^+, bir sübstrattan bir hidrojen iyonu (H^+) ile iki adet elektron (e^-) alarak, NADH'ı oluşturur. NADH ise, bu elektronları ikinci bir sübstrata aktararak tekrar NAD^+ oluşturur. Böylece, NAD^+ elektronları bir sübstrattan (yükseltgenir) diğerine (indirgenir) taşımaktadır.

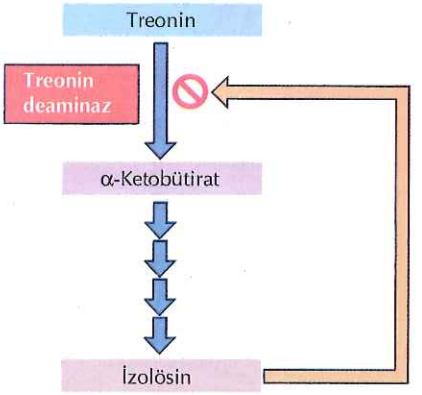
Birçok diğer koenzimler de elektron taşıyıcıları olarak davranırlar; bazıları da çok çeşitli başka kimyasal grupların transferi ile ilişkilidir (örn., karboksil ve açil gruplar; Tablo 2.1). Aynı koenzimler, çeşitli enzimlerle birlikte işlev görerek spesifik kimyasal grupların geniş bir sübstrat yelpazesi içinde transferini katalizlerler. Birçok koenzimler, vitaminlerle sıkıca ilişkilidir; vitaminler koenzim yapısının bir kısmını ya da tümünü sağlarlar. Vitaminlere, *E. Coli* gibi bakteriler gereksinim duymazlar ancak, bu bileşikleri sentez kapasitesini kaybetmiş olan insanlar ve diğer gelişmiş hayvanlarda diyetin gerekli bileşenleridir.

Enzim Aktivitesinin Regülasyonu

Enzimlerin çoğunluğunun önemli bir özelliği, etkinliğinin sürekli olmayıp denetlenebilir olmasıdır. Diğer bir deyişle, enzimlerin aktivitesi düzenlenebilmekte ve böylece enzimler hücrenin yaşamı boyunca ortaya çıkabilen çeşitli fizyolojik gereksinimleri karşılayabilecek şekilde işlev görebilmektedirler.

TABLO 2.1 Koenzim ve Vitamin Örnekleri

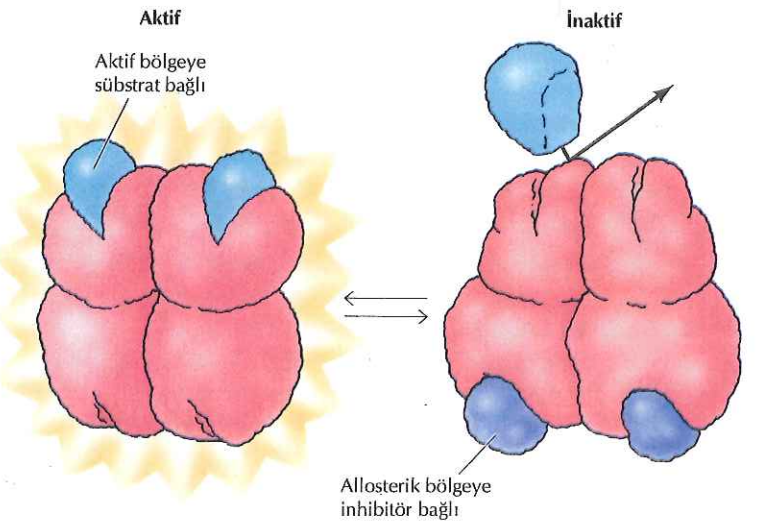
Koenzim	İlgili vitamin	Kimyasal reaksiyon
NAD^+, $NADP^+$	Niyasin	Yükseltgeme-indirgeme
FAD	Riboflavin (B_2)	Yükseltgeme-indirgeme
Tiyamin pirofosfat	Tiyamin (B_1)	Aldehid grup transferi
Koenzim A	Pantotenat	Açil grup transferi
Tetrahidrofolat	Folat	Bir karbonlu grupların transferi
Biyotin	Biyotin	Karboksilasyon
Piridoksal fosfat	Piridoksal (B_6)	Transaminasyon



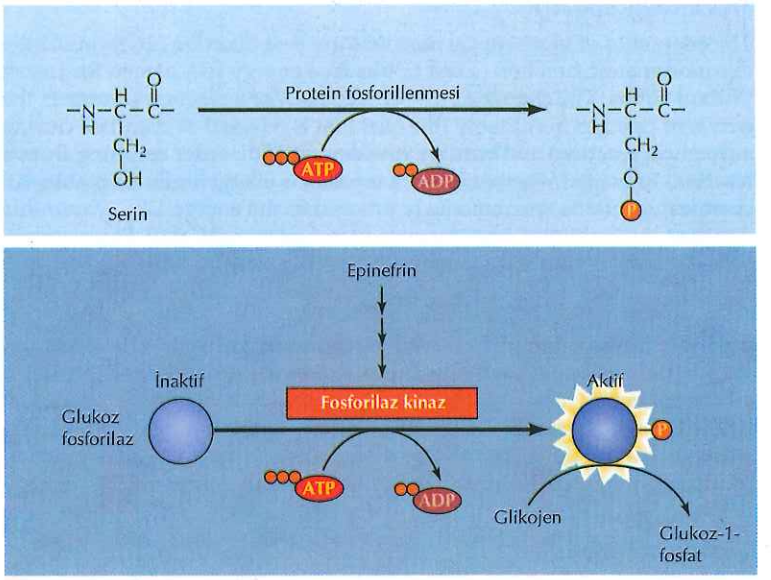
Şekil 2.28 Geriye tepki inhibisyonu
Treoninin izolösine dönüşümünde ilk basamak treonin deaminaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzimin etkinliği, yolun son ürünü olan izolösin tarafından inhibe edilmektedir.

Sık rastlanan bir enzim regülasyon türü **geriye tepki inhibisyonu** (feedback inhibition) olup, metabolik yolun ürünü kendisinin sentezinde rol alan enzimi inhibe etmektedir. Örneğin, izolösin amino asiti treonin amino asitinden başlayarak bir dizi reaksiyon ile katalizlenir (Şekil 2.28). Yolun ilk basamağı treonin deaminaz enzimi tarafından katalizlenmekte ve bu reaksiyon, yolun son ürünü olan izolösin tarafından inhibe edilmektedir. Böylece, hücre içinde yeterli miktarda izolösin, treonin deaminaz enzimini inhibe etmekte, izolösinin daha fazla sentezini bloke etmektedir. İzolösin konsantrasyonu düştüğünde ise, geriye tepki inhibisyonu kaldırılmakta, treonin deaminaz artık inhibe olmamakta ve izolösin yeniden sentezlenmektedir. Treonin deaminaz aktivitesini regüle ederek, hücre gerekli miktarda izolösin sentezlemekte ve gereğinden fazla izolösin sentezi ile enerji israfını önlemektedir.

Geriye tepki inibisyonu, **allosterik regülasyon**'un bir örneğidir. Allosterik regülasyon, enzim aktivitesinin küçük moleküllerin enzim üzerinde regülatör bölgelere bağlanması ile kontrol edildiği bir regülasyon türüdür (Şekil 2.29). "Allosterik regülasyon" terimi, regülatör moleküllerin, enzimin katalitik yüzeyine değil, protein üzerinde başka bir bölgeye (*allo* = "diğer" ve sterik = "bölge") bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Regülatör molekülün bağlanması proteinin konformasyonunu değiştirmekte; bu da, aktif yüzeyin şeklini değiştirerek enzimin katalitik aktivitesini etkilemektedir. Treonin deaminaz örneğinde, regülatör molekülün (izolösin) bağlanması



Şekil 2.29 Allosterik regülasyon
Bu örnekte, enzim aktivitesi, regülatör bir molekülün allosterik bölgeye bağlanmasıyla inhibe edilmektedir. İnhibitörün yokluğunda, sübstrat, enzimin aktif yüzeyine bağlanmakta ve reaksiyon ilerlemektedir. Allosterik yüzeye bir inhibitörün bağlanması enzimde konformasyonel bir değişiklik yaratmakta ve sübstratın bağlanmasını önlemektedir. Allosterik enzimlerin çoğunluğu birden çok alt birim içermektedir.



Şekil 2.30 Proteinlerin fosforillenmesi
Bazı enzimler, serin, treonin ya da tirozinin yan zincir OH gruplarına fosfat gruplarının eklenmesi ile regüle edilirler (burada görüldüğü gibi). Örneğin, glikojenin glukoz-1-fosfata yıkılımını katalizleyen glikojen fosforilaz enzimi, epinefrinin kas hücrelerine bağlanmasına yanıt olarak oluşan fosfatlanma yoluyla aktive edilir.

enzimatik aktiviteyi inibe etmektedir. Diğer bazı durumlarda, regülatör moleküller, hedef enzimlerini inhibe etmek yerine, aktivatör olarak işlev yapmaktadır.

Enzimlerin aktiviteleri, diğer proteinlerle etkileşimler yoluyla ve kovalent modifikasyonlar ile de regüle edilebilmektedir: serin, treonin veya tirozine fosfat gruplarının eklenmesi gibi. **Fosforillenme,** enzim aktivitesinin regülasyonuunda ortak bir mekanizmadır; fosfat gruplarının eklenmesi, çeşitli enzimlerin aktivitelerini artırabilir ya da inhibe edebilir (Şekil 2.30). Örneğin, kas hücreleri epinefrine (adrenalin), glikojeni glukoza yıkarak yanıt verirler; böylece, artan kas aktivitesi için enerji kaynağı sağlanmaktadır. Glikojenin yıkılımı glikojen fosforilaz enzimi tarafından katalizlenmektedir; bu da, epinefrinin kas hücre yüzeyinde bir reseptöre bağlanmasına yanıt olarak oluşan fosforillenme ile aktive olmaktadır. Protein fosforillenmesi, yalnızca metabolik reaksiyonların değil, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi birçok diğer hücresel fonksiyonların kontrolünde de merkezi bir role sahiptir.

Metabolik Enerji

Hücrenin gerçekleştirmesi gereken birçok iş, örneğin, hareket ve makromoleküllerin sentezi enerji gerektirmektedir. Hücrenin aktivitelerinin büyük kısmı çevreden enerji elde etmeye ve bu enerjiyi, enerji gerektiren reaksiyonlarda kullanmaya yöneliktir. Hücrelerde yer alan hemen tüm reaksiyonların hızları enzimler tarafından kontrol edilmekte ise de, kimyasal reaksiyonların denge durumları, enzimatik katalizle değişikliğe uğramaz. Termodinamiğin yasaları kimyasal dengeleri yönetmekte ve tüm kimyasal reaksiyonların enerjetik durum lehine yönlenmelerini sağlamaktadır. Hücrelerde gerçekleşmesi gereken reaksiyonların birçoğu enerjetik yönden uygun olmadığından, ancak, enerji verilerek oluşabilmektedir. Dolayısıyla, hücreler sürekli olarak çevreden sağladıkları enerjiyi kullanmaktadır. Tüm hücre biyolojisinin temelinde, metabolik enerjinin üretimi ve kullanılması yatmaktadır.

Serbest Enerji ve ATP

Biyokimyasal reaksiyonların enerjetiği, en iyi, Josiah Willard Gibbs için **Gibbs serbest enerjisi (*G*)** olarak adlandırılmış termodinamik fonksiyon ile tanımlanır. Bir reaksiyonun serbest enerji değişimi (ΔG), entalpi (kimyasal reaksiyon sırasında serbestleşen ya da absorplanan ısı) ile entropi (reaksiyondan sonuçlanan düzensizlik derecesi) değişikliklerinin etkilerini kombine ederek bir reaksiyonun enerjetik olarak uygun olup olmadığını öngörmektedir. Tüm kimyasal reaksiyonlar, enerjetik olarak uygun yönde, kendiliğinden, serbest enerjideki azalma ile birlikte ($\Delta G < 0$) gerçekleşir. Örneğin, A'nın B'ye dönüştüğü hipotetik bir reaksiyon incelendiğinde:

$$A \rightleftarrows B$$

$\Delta G<0$ ise, reaksiyon, gösterildiği şekilde, ileriye doğru yürüyecektir.

$\Delta G>0$ ise, reaksiyon ters yönde yürüyecek ve B, A'ya dönüştürülecektir.

Bir reaksiyonun ΔG'si yalnızca reaktant ve ürünlerin içsel özellikleri ile değil, aynı zamanda konsantrasyonları ve diğer reaksiyon koşulları ile de (örn., sıcaklık) belirlenmektedir. Dolayısıyla, bir reaksiyonun serbest enerji değişimini standart koşullarda tanımlamak yararlıdır (Standart koşullar, tüm reaktant ve ürünlerin 1M konsantrasyonları ve 1 atm basınç olarak düşünülür). Bir reaksiyonun standart serbest enerji değişimi (ΔG°) denge durumu ile doğrudan ilişkilidir çünkü gerçek ΔG, hem ΔG°nin, hem de reaktant ve ürünlerin konsantrasyonlarına bağlıdır. Örneğin,

$$A \rightleftarrows B$$

reaksiyonunda, serbest enerji değişimi aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [B] / [A]$$

burada R gaz sabitesi ve T absolü sıcaklıktır.

Denge durumunda, $\Delta G = 0$ ve reaksiyon hiçbir yönde ilerlemez ($K = [B] / [A]$, denge halinde) ki, reaksiyonun denge sabitesi yukarıdaki denklem ile, doğrudan ΔG° ile ilişkili olup, şu şekilde ifade edilebilir:

$$0 = \Delta G^\circ + RT \ln K$$

ya da,

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K$$

Eğer gerçek oran, [B] / [A], denge oranı (K) dan büyük ise, $\Delta G>0$ olup, reaksiyon ters yönde, (B'nin A'ya dönüşümü) ilerler. Diğer taraftan, eğer [B] / [A] oranı denge oranından küçük ise, $\Delta G<0$ olup, A, B'ye dönüşür.

Bir reaksiyonun standart serbest enerji değişimi (ΔG°), böylece, kimyasal dengesini belirler ve herhangi bir dizi koşul altında, reaksiyonun hangi yönde ilerleyeceğini öngörür. Biyokimyasal reaksiyonlar için, standart serbest enerji değişimi genelde, hücre- içi koşullara uyan, pH = 7 olan sulu bir çözeltinin serbest enerji değişimi olarak, $\Delta G^{\circ\prime}$ şeklinde gösterilmektedir.

Birçok biyolojik reaksiyon (örn., makromoleküllerin sentezi) hücresel koşullarda termodinamik olarak elverişli değildir ($\Delta G>0$). Bu reaksiyonların ilerleyebilmesi için ilave bir enerji kaynağına gereksinim vardır. Örneğin, şu reaksiyonu ele alınız:

$$A \rightleftarrows B \quad \Delta G = + 10 \text{ kcal / mol}$$

A'nın B'ye dönüşümü enerjetik yönden elverişli değildir; reaksiyon, ileri yönde değil, ters yönde ilerler. Ancak, reaksiyon, A'nın B'ye dönüşümü bir başka, enerjetik olarak elverişli bir reaksiyon, ile kenetlendiğinde:

$$C \rightleftarrows D \; ; \; \Delta G = -20 \text{ kcal / mol}$$

$$A + C \rightleftarrows B + D \; ; \; \Delta G = -10 \text{ kcal / mol}$$

Birleşmiş reaksiyonun ΔG si, her bir bileşenin ayrı ayrı serbet enerji değişiminin toplamıdır; böylece, kenetlenmiş reaksiyon enerjetik olarak elverişli olup, yazıldığı gibi ilerleyecektir. Böylece, A'nın B'ye enerjetik yönden elverişsiz olan dönüşümü, büyük bir serbest enerji düşüşü gösteren ikinci bir reaksiyon ile kenetlenerek olanaklı hale getirilmiştir. Enzimler, bu tür kenetlenmiş reaksiyonların koordineli olarak yürütülmesinden sorumludur.

Hücre, bu temel mekanizmayı, biyolojik sistemlerde yer alması gereken çok sayıda, enerjetik yönden elverişsiz reaksiyonları yürütmek için kullanır. **Adenozin 5'-trifosfat (ATP)** bu süreçte, hücrede serbest enerji deposu olarak görev alarak merkezi bir rol oynar (Şekil 2.31). ATP'nin fosfat grupları arasındaki bağlar **yüksek enerjili bağlar** olarak bilinirler çünkü hidrolizleri, serbest enerjide göreceli büyük bir düşüş ile birlikte seyreder. Kimyasal bağların kendileri özel bağlar değildir; onların yüksek enerjili bağlar olarak bilinmesi, hücre içinde hidroliz olduklarında büyük miktarda serbest enerjinin ortaya çıkması nedeniyledir. ATP'nin ADP + fosfata (P_i) hidrolizinde, $\Delta G°' = -7.3$ kcal / mol'dür. $\Delta G°'$ nin, "standard koşullara" ait olduğunu ve tüm reaktantların ve ürünlerin 1M olduğunu unutmayınız. P_i'nin gerçek hücre içi konsantrasyonları 10^{-2} M dolaylarındadır ve ATP'nin hücre içi konsantrasyonları, ADP'ninkinden daha yüksektir. Hücre içi konsantrasyonlar ile standart koşullar arasındaki bu farklılıklar, ATP hidrolizi lehine çalışmakta ve ATP hücre içinde hidrolizlendiğinde, ΔG -12 kcal/mol civarında olmaktadır.

Alternatif olarak, ATP, AMP ile pirofosfata (PP_i) hidroliz edilebilir. Bu reaksiyon, ATP'nin ADP'ye hidrolizinde açığa çıkan kadar bir serbest enerji miktarını açığa çıkarır. Ancak, bu reaksiyonda üretilen pirofosfatın kendisi, ATP hidrolizindekine benzer bir ΔG ile hızlıca hidroliz olur. Böylece, ATP'nin AMP'ye hidroliz edilmesinde açığa çıkan toplam serbest enerji miktarı, ATP'nin ADP'ye hidrolizinde açığa çıkanın iki katı dolayındadır. Kıyaslamak amacıyla, AMP'de şeker ile fosfat arasındaki bağ, yüksek enerjili olmayıp kovalent bağ özelliğindedir; AMP'nin hidrolizinde $\Delta G°' = -3.3$ kcal / mol'dür.

ATP hidrolizi, serbest enerjideki birlikte seyreden düşüş nedeni ile, hücrede diğer enerji gerektiren reaksiyonların yürütülmesi için kullanılabilir. Örneğin, glikolizdeki birinci reaksiyon (bir sonraki kısımda tartışılmıştır) glukozun glukoz-6-fosfata dönüşümüdür. Reaksiyon şu şekilde yazılabilir:

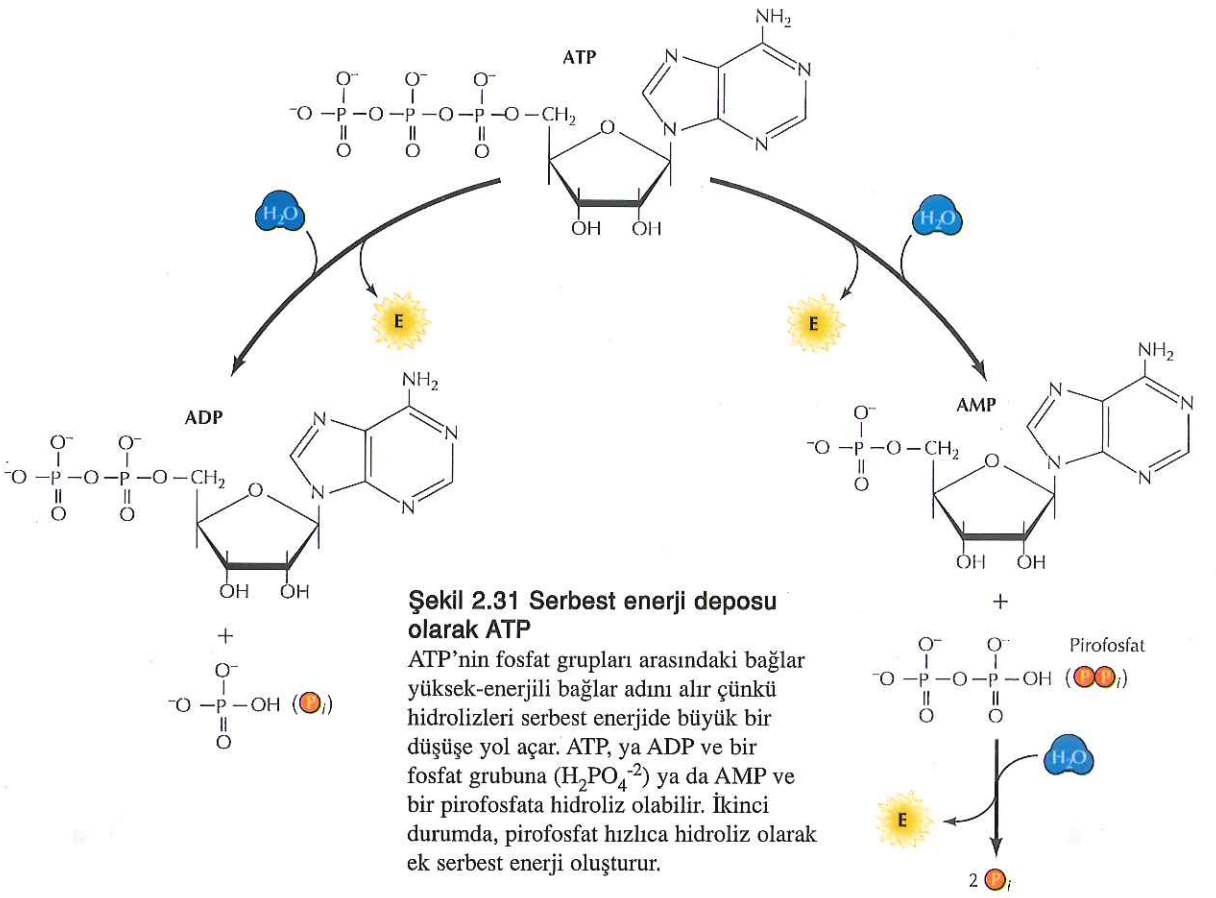
$$\text{Glukoz} + \text{Fosfat } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glukoz-6-fosfat} + H_2O$$

Reaksiyon bu şekilde yazıldığında, enerjetik yönden elverişsiz ($\Delta G°' = +3.3$ kcal / mol) olduğundan, ileri yönde yürümesi için ATP hidrolizine ($\Delta G°' = -7.3$ kcal / mol) kenetlenmesi gerekmektedir:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

Birleşik reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$\text{Glukoz} + ATP \rightarrow \text{Glukoz-6-fosfat} + ADP$$



Şekil 2.31 Serbest enerji deposu olarak ATP
ATP'nin fosfat grupları arasındaki bağlar yüksek-enerjili bağlar adını alır çünkü hidrolizleri serbest enerjide büyük bir düşüşe yol açar. ATP, ya ADP ve bir fosfat grubuna ($H_2PO_4^{-2}$) ya da AMP ve bir pirofosfata hidroliz olabilir. İkinci durumda, pirofosfat hızlıca hidroliz olarak ek serbest enerji oluşturur.

Bu reaksiyon için serbest enerji değişimi, tek tek reaksiyonların serbest enerji değişimlerinin toplamıdır; böylece, kenetlenmiş reaksiyon için $\Delta G^{\circ\prime}$ = -4.0 kcal/mol olup, glukoz-6-fosfat oluşumu lehinedir.

Aralarında nükleozid trifosfatların (örn., GTP) da bulunduğu bazı diğer moleküllerde de yüksek-enerjili bağlar mevcut olup enerji gerektiren reaksiyonlarda ATP gibi kullanılabilirler. Ancak, reaksiyonların çoğunluğunda serbest enerjiyi sağlayan molekül ATP'dir. Dolayısıyla, hücre içinde enerji üreten reaksiyonlar ATP sentezi ile, enerji gerektirenler ise, ATP hidrolizi ile kenetlenmiştir. ATP'nin yüksek enerjili bağları, hücre metabolizmasında, serbest enerjinin kullanılabilir depo formunu oluşturarak merkezi bir rol oynamaktadır.

Glukozdan ATP Üretimi

Karbohidratların ve özellikle glukozun yıkılımı hücresel enerjinin temel kaynağıdır. Glukozun CO_2 ve H_2O'ya tam oksidasyonu aşağıdaki gibi gösterilebilir:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

Reaksiyon, büyük miktarda serbest enerji açığa çıkarır: $\Delta G^{\circ\prime}$ = -686 kcal/mol. Bu serbest enerjiyi kullanılabilir formunda tutabilmek için, glukoz, hücrelerde ATP sentezine kenetlenen bir dizi reaksiyonla yükseltgenir.

Glikoliz glukoz yıkılımında ilk evre olup hemen tüm hücrelerde yer alır. Glikoliz oksijen yokluğunda gerçekleşir ve de anaerobik organizmaların tüm metabolik enerjisini sağlar. Ancak, aerobik hücrelerde, glikoliz glukoz yıkılımında sadece ilk evredir.

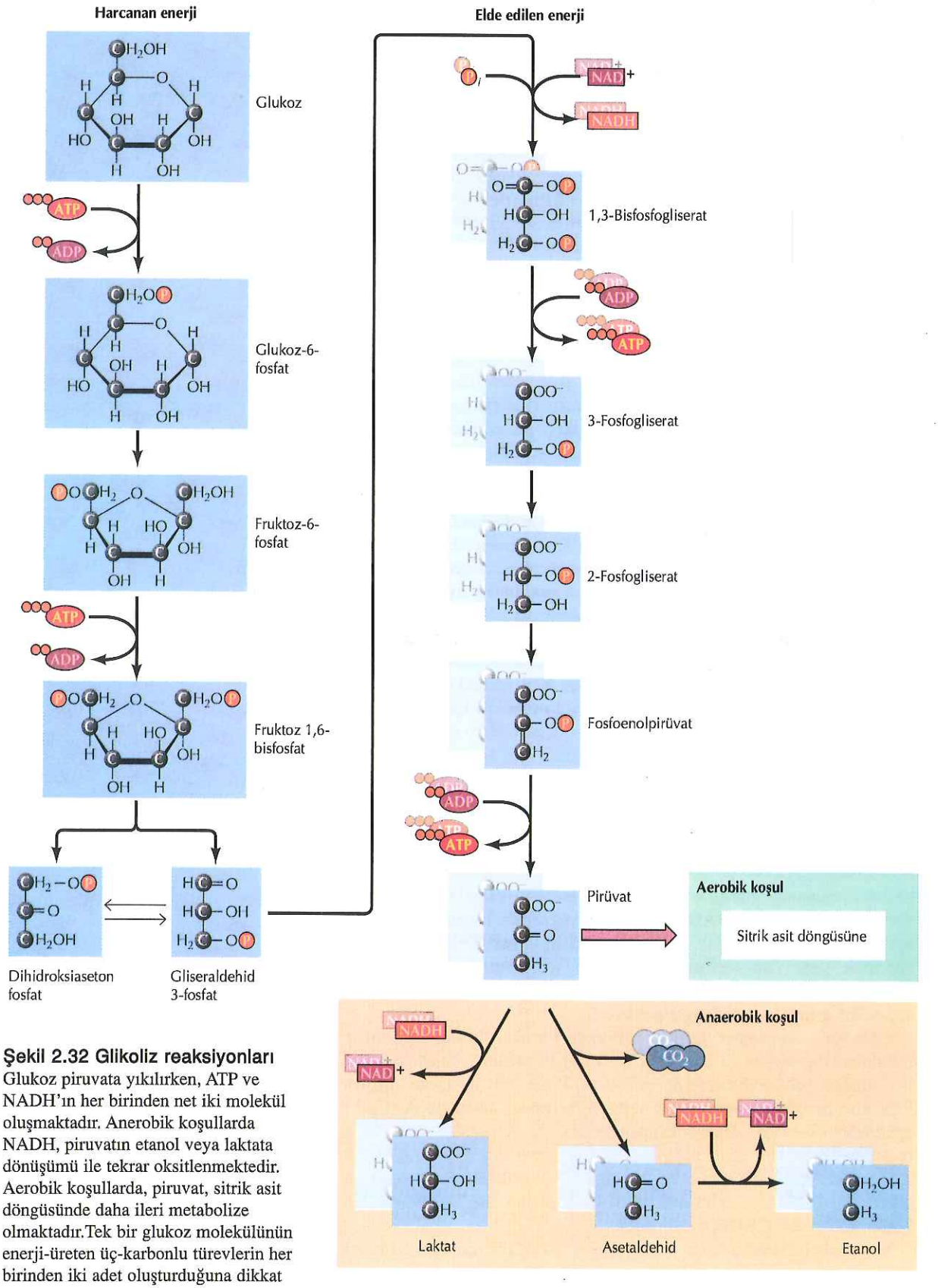
Glikoliz reaksiyonlarında glukozun piruvata yıkılımı, iki net ATP üretimi ile sonuçlanır (Şekil 2.32). Metabolik yoldaki ilk reaksiyonlar gerçekte enerji gerektirir; glukozun glukoz-6-fosfata ve daha sonra fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-bisfosfata fosforillenmesi için ATP kullanılır. Bu iki reaksiyonu katalizleyen enzimler -sırasıyla, heksokinaz ve fosfofruktokinaz- glikolitik yolun önemli kontrol noktalarıdır. Anahtar kontrol elemanı fosfofruktokinaz olup, ATP'nin yüksek düzeyleri ile inhibe olmaktadır. Fosfofruktokinazın inhibisyonu glukoz-6-fosfatın birikimine neden olmakta ve bu da, heksokinazı inhibe etmektedir. Böylece, hücrenin ATP olarak elde edilebilir enerji kaynağının bulunduğu durumda, glukozun yıkılımı durdurulmaktadır.

Fruktoz-6-fosfatın üretimini izleyen reaksiyonlar glikolitik dizinin enerji üreten bölümünü oluşturmaktadır. Fruktoz-1,6-bisfosfatın parçalanması, iki adet üç-karbonlu şeker gliseraldehid-3-fosfatı oluşturmakta, bu da, 1,3-bisfosfogliserata yükseltgenmektedir. Bu bileşiğin fosfat grubu hidroliz edildiğinde, çok yüksek miktarda serbest enerji açığa çıktığından ($\Delta G^{\circ\prime} = -11.5$ kcal / mol), glikolizin bir sonraki reaksiyonunda ADP'den ATP sentezi için kullanılmaktadır. Bu reaksiyonun ürünü olan 3-fosfogliserat, daha sonra, glikolizde ikinci yüksek enerjili ara bileşik olan fosfoenolpiruvata dönüşmektedir. Fosfoenolpiruvatın yüksek enerjili fosfat grubunun ($\Delta G^{\circ\prime} = -14.6$ kcal/mol) hidroliz edilerek piruvata dönüşümü, ATP sentezi ile kenetlenmiştir. Her bir gliseraldehid-3-fosfat molekülünün piruvata dönüşümü, iki adet ATP molekülünün oluşumu ile kenetlenmiştir; total olarak, başlangıçtaki glukoz molekülünden, dört adet ATP sentezlenir. Başlangıçtaki reaksiyonlarda iki adet ATP harcandığı için, glikolizde net kazanım iki ATP molekülüdür.

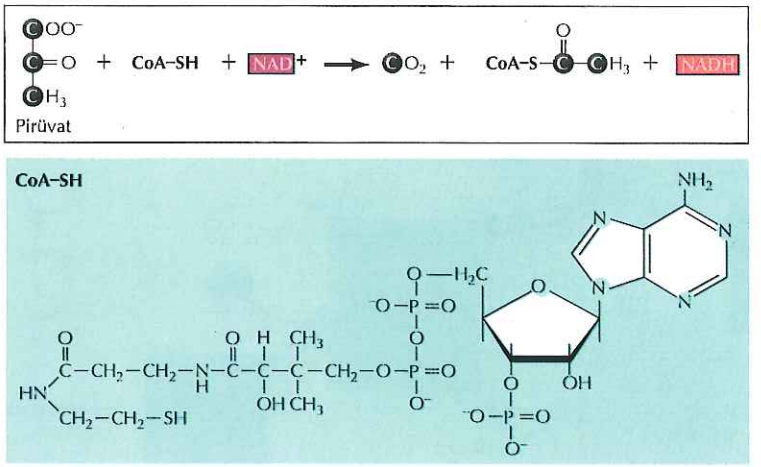
ATP üretiminin yanı sıra, glikoliz, iki molekül NAD^+ koenzimini NADH'a dönüştürmektedir. Bu reaksiyonda, NAD^+, gliserladehid-3-fosfattan elektronları kabul eden yükseltgeyici faktör olarak görev almaktadır. Ürün olarak oluşan NADH, hücre içindeki diğer yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında elektron verici olarak kullanılarak, NAD^+ ye geri dönüşmektedir. Anaerobik koşullarda, glikoliz sırasında üretilen NADH, piruvatın laktata veya etanole dönüşümü sırasında NAD^+'ye tekrar yükseltgenmektedir. Ancak, aerobik organizmalarda, NADH, elektronlarını elektron taşıma zincirine verir; bu elektronlar zincirin sonunda, O_2'nin H_2O'ya indirgenmesini sağlayarak, ilave ATP'nin oluşumu ile kenetlenir; bu da, ek bir enerji kaynağı sağlamaktadır.

Ökaryotik hücrelerde, glikoliz sitozolde yer alır. Piruvat daha sonra mitokondriye taşınır ve burada, CO_2 ve H_2O'ya tam yükseltgenmesi ile, glukoz yıkılımından elde edilen ATP'nin büyük kısmı oluşur. Piruvatın metabolizmasında bir sonraki basamak, **koenzim A (CoA)** eşliğinde oksidatif dekarboksilasyonudur; CoA, çeşitli metabolik reaksiyonlarda açil grup taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.33). Piruvatın karbonlarından bir tanesi, CO_2 olarak serbestleşir ve diğer ikisi de CoA'ya eklenerek asetil CoA oluşturulur. Bu süreçte, bir NAD^+ molekülü NADH'a indirgenir.

Bu reaksiyonda oluşan asetil CoA, oksidatif metabolizmanın merkezi yolu olan **sitrik asit döngüsü** ya da, **Krebs döngüsü**'ne girer (Şekil 2.34). İki karbonlu asetil grubu dört karbonlu oksaloasetat ile



Şekil 2.32 Glikoliz reaksiyonları
Glukoz piruvata yıkılırken, ATP ve NADH'ın her birinden net iki molekül oluşmaktadır. Anerobik koşullarda NADH, piruvatın etanol veya laktata dönüşümü ile tekrar oksitlenmektedir. Aerobik koşullarda, piruvat, sitrik asit döngüsünde daha ileri metabolize olmaktadır.Tek bir glukoz molekülünün enerji-üreten üç-karbonlu türevlerin her birinden iki adet oluşturduğuna dikkat ediniz.

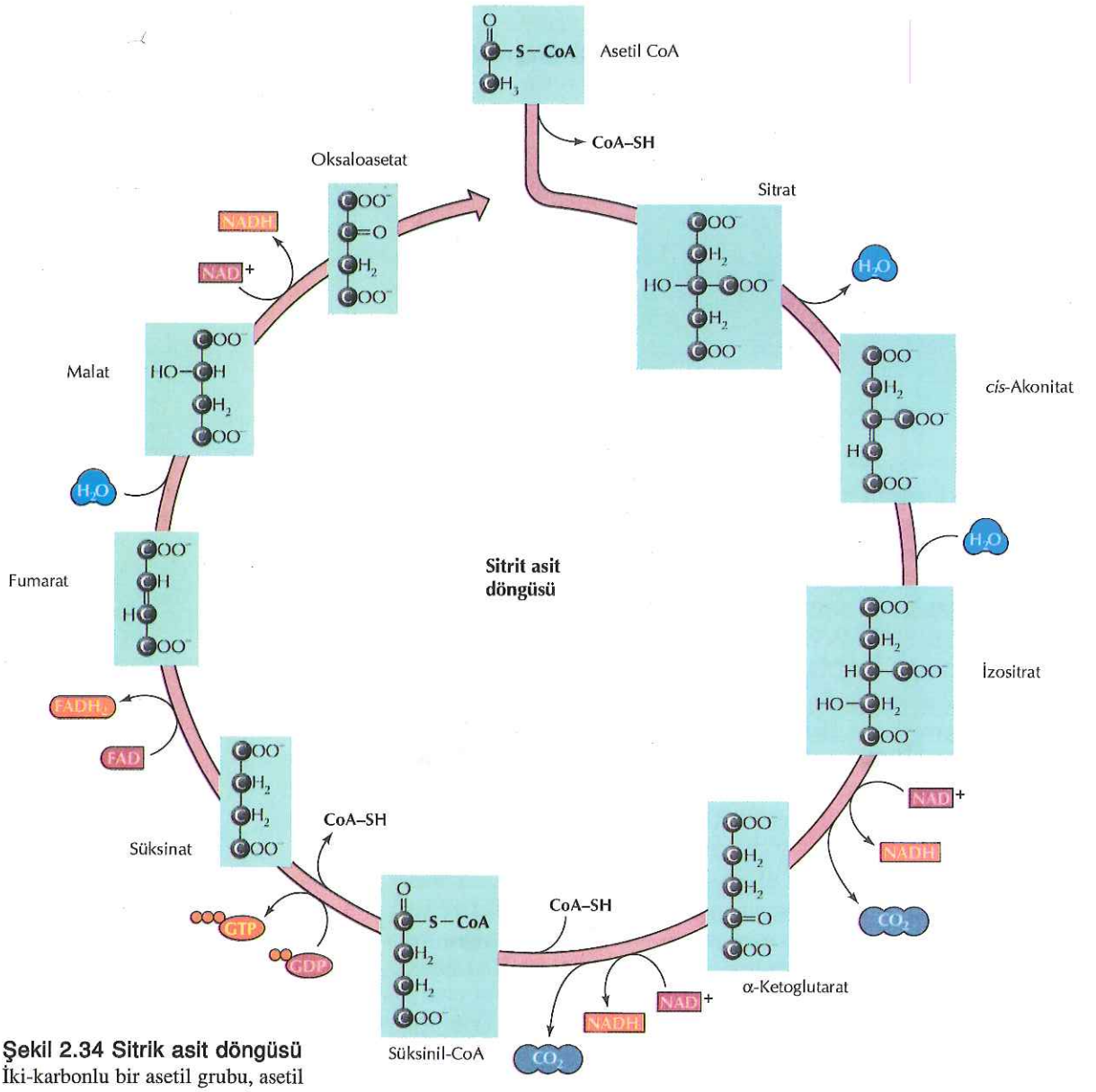


Şekil 2.33 Pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonu
Piruvat, CO_2 ve asetil CoA'ya dönüşmekte ve bu olay sırasında bir adet NADH molekülü oluşmaktadır. Koenzim A (CoA-SH), çok çeşitli reaksiyonlarda aktif açil gruplarının genel taşıyıcısıdır.

birleşerek altı karbonlu sitratı oluşturur. Daha sonraki sekiz reaksiyon ile, sitratın iki karbon atomu CO_2'e tam olarak oksitlenir ve oksaloaset oluşur. Döngü sırasında, bir yüksek-enerjili fosfat bağı GTP'de oluşur; bu da, bir ATP molekülünün sentezini sürükler. İlave olarak, döngünün her bir dönüşünde, üç NADH molekülü ve yükseltgeme-indirgeme reaksiyonlarında bir başka elektron taşıyıcısı olan indirgenmiş **flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$)** molekülünden bir adet ortaya çıkar.

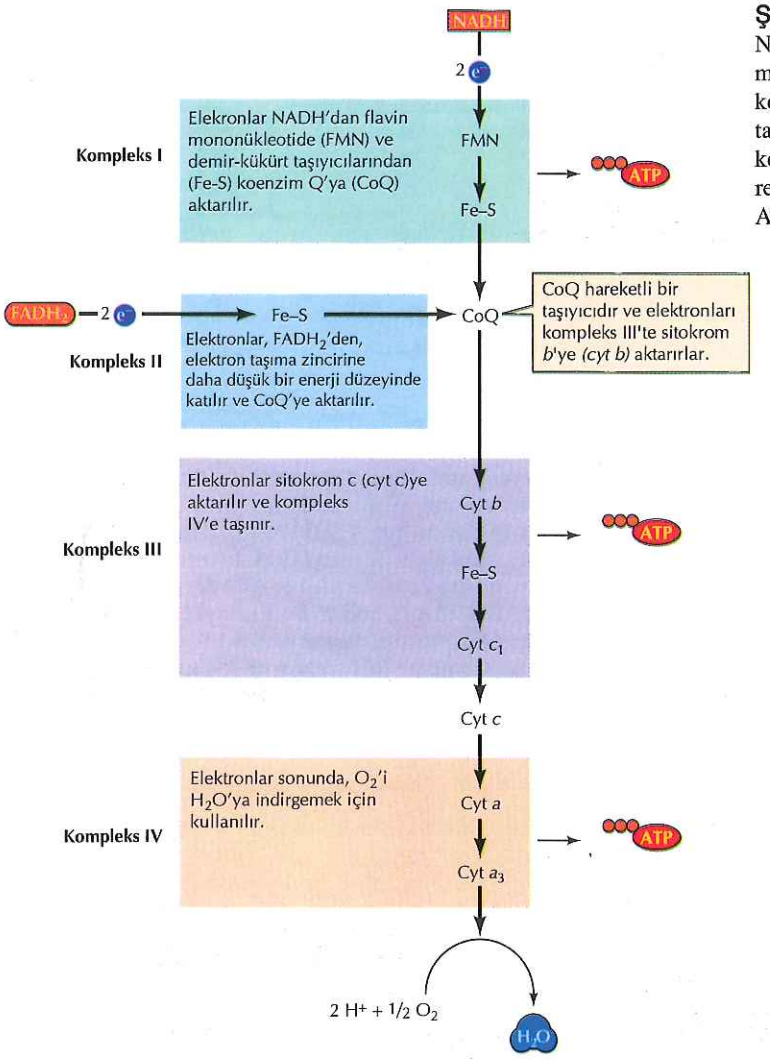
Sitrik asit döngüsünde, glukozun altı adet CO_2 molekülüne oksitlenmesi gerçekleşir. Her bir glukoz molekülünden, dört adet ATP molekülü, doğrudan elde edilir - ikisi glikolizden ve ikisi de sitrik asit döngüsünden (her bir piruvat molekülünden birer adet). Buna ilave olarak, on adet NADH molekülü (İki adet glikolizden, iki adet piruvatın asetil CoA'ya dönüşümünden ve altı adet sitrik asit döngüsünden) ile iki adet $FADH_2$ molekülü oluşmaktadır. Glukozun yıkılımından elde edilen enerjinin geri kalan bölümü, NADH ve $FADH_2$'ın elektronlarının elektron taşıma zincirine aktarılması ve (sonunda) O_2'i H_2O'ya indirgemede kullanılarak, yeniden yükseltgenmesiyle kazanılır.

Oksidatif fosforilasyon sırasında, NADH ve $FADH_2$'ın elektronları O_2 ile birleşirler ve etkileşimde serbest kalan enerji, ADP'den ATP'nin sentezinde itici güç oluşturur. Elektronların NADH'dan $FADH_2$'ye transferi büyük miktarda serbest enerji açığa çıkarır: transfer edilen her bir elektron çifti için, $\Delta G^{\circ\prime}$ = -52.5 kcal / mol. Bu enerjinin kullanılabilir formda kazanılabilmesi için, bu süreç, elektronların aşamalı olarak bir dizi taşıyıcıdan geçirilmesiyle - **elektron taşıma zinciri-** gerçekleşir (Şekil 2.35). Elektron taşıma zincirinin bileşenleri ökaryot hücrelerin iç mitokondri zarında yerleşim gösterir. Oksidatif fosforilasyon, 10. Bölüm'de mitokondriler ele alındığında daha ayrıntılı olarak işlenecektir. Benzer bir sistemi kullanan aerobik bakterilerde, elektron taşıma sisteminin bileşenleri plazma zarında yerleşmiştir. Her iki durumda da, NADH'dan O_2'e elektronların transferi üç dolayında ATP molekülünün sentezini sürüklemeye yetecek kadar enerji açığa çıkarır. $FADH_2$'ın elektronları, elektron transport zincirine daha düşük bir enerji düzeyinde girdiğinden, O_2'e transferleri ile daha az miktarda kullanılabilir enerji- yalnızca iki adet ATP molekülü- elde edilir.



Şekil 2.34 Sitrik asit döngüsü
İki-karbonlu bir asetil grubu, asetil CoA'dan oksaloasetata taşınarak sitrat oluşturulur. Sonra, sitratın iki karbonu CO_2'e oksitlenir ve oksaloasetat yeniden elde edilir. Döngünün her bir dönüşü bir adet GTP molekülü, üç NADH ve bir $FADH_2$ üretir.

Artık, glukozun oksitlenmesinden elde edilen total enerjiyi hesaplamak mümkündür. Glikolizden elde net, iki ATP molekülü ve iki NADH molekülüdür. Piruvatın asetil CoA'ya dönüşümü ve sitrik asit döngüsünde metabolize edilmesinden ek iki ATP molekülü, sekiz NADH molekülü ve iki $FADH_2$ kazanılır. Her bir NADH molekülünün yükseltgenmesinden üç ATP molekülü ve her bir $FADH_2$ molekülünün yükseltgenmesinden iki ATP'nin kazanıldığı düşünüldüğünde, bir glukoz molekülünün total verimi 38 ATP molekülüdür. Ancak, bu verim bazı hücrelerde daha düşüktür çünkü glikolizden sitozolde elde edilen iki NADH molekülü mitokondriye doğrudan girememektedir. Bunun yerine, elektronların, mitokondriye bir mekik sistemi ile transfer edilmesi gerekmektedir. Kullanılan sisteme bağlı olarak, bu aktarımda, elektronların elektron taşıma zincirine $FADH_2$ düzeyinde girmeleri söz konusu olabilir. Bu durumlarda, glikolizden elde edilen

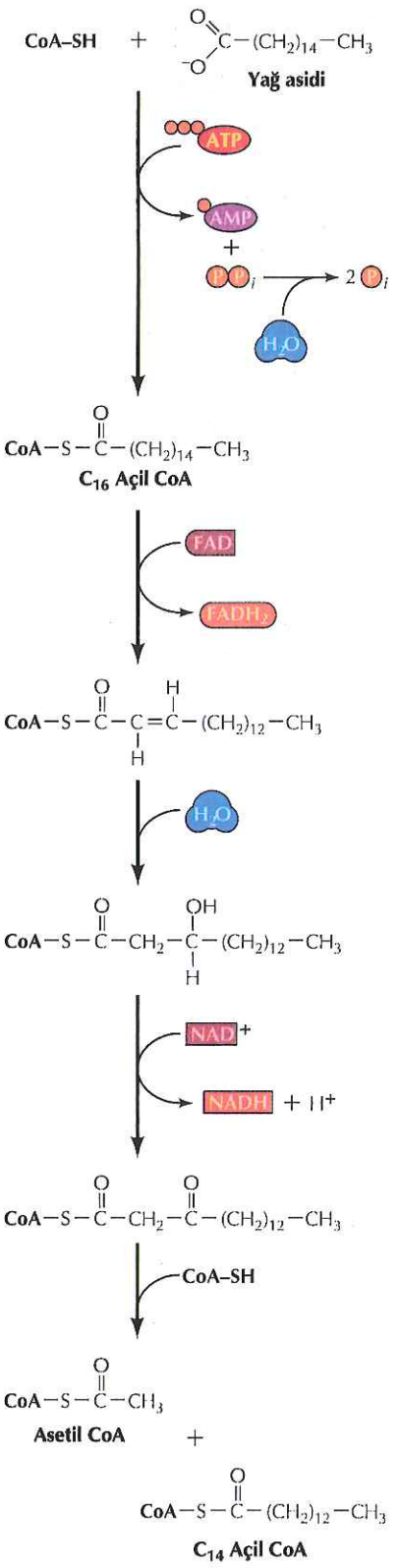


Şekil 2.35 Elektron taşıma zinciri
NADH ve $FADH_2$'nin elektronları, mitokondriyal zarda dört adet protein kompleksi olarak yapılandırılmış bir dizi taşıyıcı yoluyla, O_2'e aktarılır. I, II ve IV. komplekslerdeki elektron taşıma reaksiyonlarından elde edilen serbest enerji, ATP sentezi için itici güç oluşturur.

iki NADH molekülü, üç yerine iki ATP molekülü ile sonuçlanır ki, glukoz molekülü başına total elde, 38 yerine 36 ATP olur.

Diğer Organik Moleküllerden Enerji Sağlanması

ATP formundaki enerji, başka organik moleküllerin yıkılımından da elde edilebilir; glukoz yıkılımı yolları, burada da merkezi rol oynar. Örneğin, nükleotidler, şekerlere yıkılabilirler ki bunlar da glikolitik yola girerler; amino asitler, sitrik asit döngüsünde yıkılırlar. Hücrelerdeki iki temel enerji deposunu oluşturan polisakkaridler ve lipidler de ATP üretmek üzere yıkılabilirler. Polisakkaridler serbest şekerlere yıkılırlar; bunlar da önceki başlıkta ele alındığı gibi metabolize olurlar. Lipidler ise, daha de verimli enerji depo molekülleridir. Temelde hidrokarbon zincirlerinden oluşmuş olan lipidler, karbohidratlara göre daha indirgenmiş olduklarından, yükseltgenmeleri, başlangıç materyali ağırlığı başına, oldukça daha fazla enerji açığa çıkartır.



Şekil 2.36 Yağ asitlerinin oksidasyonu
Yağ asidi (örn., 16-karbonlu doymuş yağ asidi palmitat) önce CoA'ya, bir molekül ATP'nin harcanmasıyla bağlanır. Yağ asitinin oksidasyonu daha sonra basamak basamak iki-karbonlu birimlerin, birer molekül NADH ve $FADH_2$ oluşumuna kenetlenmiş olarak, asetil CoA olarak ayrılmasıyla ilerler.

Yağlar (triaçilgliseroller) lipidlerin temel depo formlarıdır. Kullanımlarında ilk basamak, gliserol ve yağ asitlerine yıkılmalarıdır. Her bir yağ asiti, bir molekül ATP harcayarak koenzim A'ya bağlanır ve açil-CoA oluşturur (Şekil 2.36). Daha sonra, yağ asitleri basamaklı bir oksidatif süreç ile, her defasında iki karbon olmak üzere, yıkılarak asetil CoA ile iki karbon birimi eksik açilCoA üretir. Her bir oksidasyonda, aynı zamanda, bir NADH ve bir $FADH_2$ molekülü ortaya çıkar. Daha sonra asetil CoA sitrik asit döngüsüne girer ve yağ asitinin kalan bölümünün yıkılımı benzer biçimde sürer.

Böylece, 16-karbonluk bir yağ asitinin yıkılımı yedi NADH molekülü, yedi $FADH_2$ molekülü ve sekiz asetil CoA molekülü oluşturur. ATP üretimi yönünden bilanço: NADH'dan elde edilen 21 ATP molekülü (3 x 7), FADH' den 14 ATP (2 x 7) ve asetil CoA'dan 96 (8 x 12) ATP'dir. Reaksiyonların başlangıcında bir adet ATP harcanmış olduğundan, net kazanç, 16-karbonlu bir yağ asiti için 130 ATP'dir. Bunun verimi ile, bir molekül glukozdan elde edilen net 38ATP'yi karşılaştırınız. Doymuş bir onaltı-karbonlu yağ asidinin molekül ağırlığı 256, glukozunki ise 180 olduğundan, ATP üretimi gram yağ asiti başına, 2.5 kat daha fazladır- bu da, lipidlerin depo molekülleri olarak polisakkaridlere üstünlüğünü gösterir.

Fotosentez

Karbohidratların ve lipidlerin oksidasyonu ile enerji üretimi, önceden oluşmuş organik moleküllerin yıkılımına bağlıdır. Bu bileşiklerin sentezi için gerekli enerji en sonda güneş ışığından elde edilir; güneş ışığı, bitkiler ve fotosentetik bakteriler tarafından tutulmakta ve karbohidratların sentezi için itici güç olarak kullanılmaktadır. Güneş ışığının enerjisini kullanılabilir bir kimyasal enerji formuna dönüştüren fotosentez, gerçekte biyolojik sistemlerin tüm metabolik enerjisinin kaynağıdır.

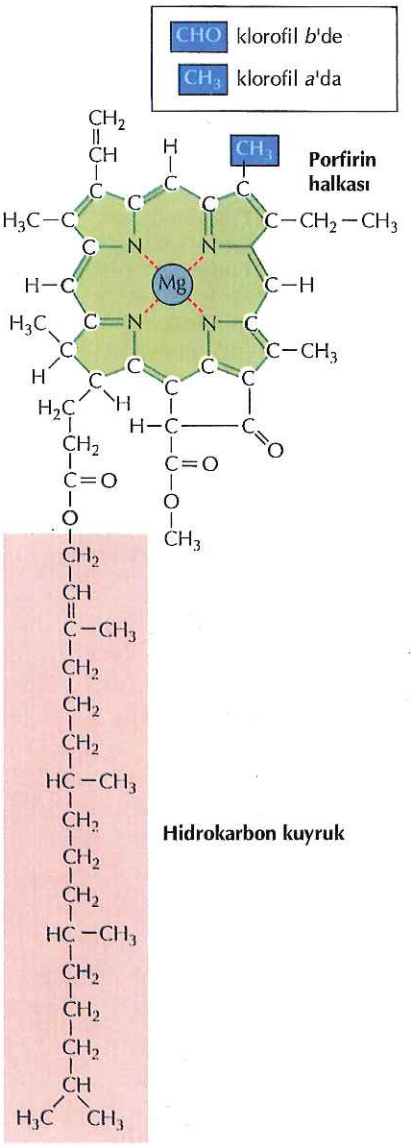
Fotosentezin genel denklemi aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Işık}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

Ancak, bu süreç çok daha kompleks olup iki ayrı evreden oluşmaktadır. **Işık reaksiyonları** adı verilen birinci evrede, güneş ışığından absorblanan (soğrulan) enerji, H_2O'nun O_2'e yükseltgenmesi ile kenetlenmiş olarak, ATP ve NADPH'ın (NADH'a benzer bir koenzim) sentezini sürükler. Işık reaksiyonları ile üretilen ATP ve NADPH, güneş ışığı gerektirmedikleri için **karanlık reaksiyonlar** adı verilen ikinci evrede, CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların sentezi için itici güç olur. Ökaryotik hücrelerde, hem ışık hem de karanlık reaksiyonlar kloroplastlarda yer alır.

Fotosentetik pigmentler (boyalar), fotonları soğurarak güneş ışığından enerji çekerler. Bu pigmentler tarafından ışığın soğurulması

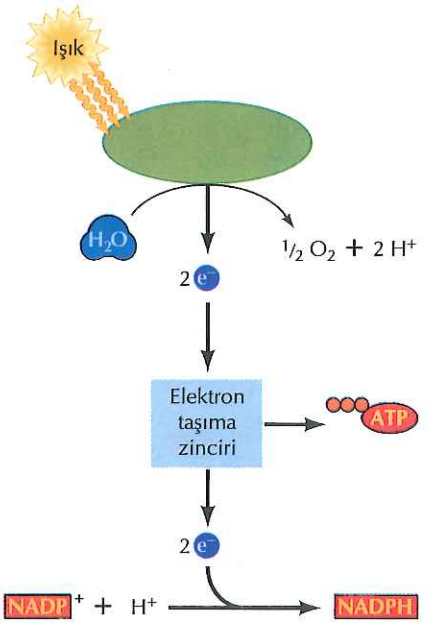
Şekil 2.37 Klorofilin yapısı
Klorofiller hidrokarbon kuyruklarına bağlı porfirin yapılarından oluşmuşlardır. Klorofil ***a*** ve *b* porfirin halkada tek bir fonksiyonel grup açısından farklılık gösterir.



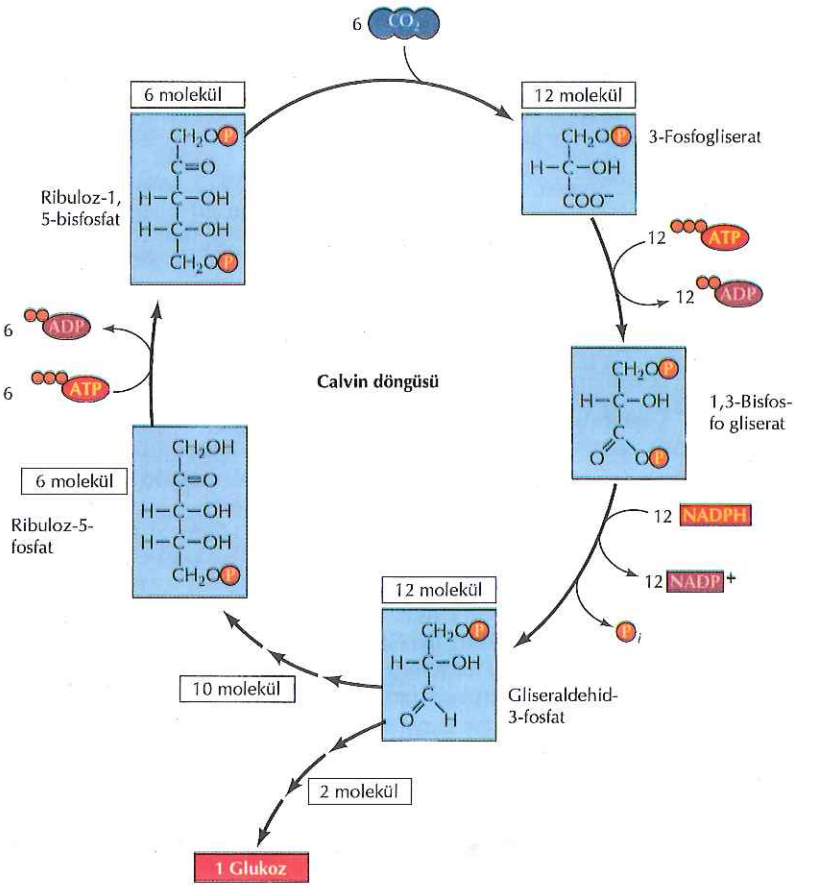
bir elektronun, normal moleküler orbitalinden bir üst düzeye atlamasına neden olur ve bu şekilde güneş ışığının enerjisi kimyasal enerjiye dönüşür. Bitkilerde en bol bulunan fotosentetik pigmentler **klorofillerdir** (Şekil 2.37) ki yeşil dışında görünür ışığın tüm dalga boylarını soğururlar. Başka pigmentler başka dalga boylarındaki ışığı soğururlar; böylece görünür ışığın spektrumunun tamamı fotosentez için yakalanıp kullanılabilir.

Işığın absorplanması ile yakalanan enerji H_2O'yu O_2'e dönüştürmede kullanılır (Şekil 2.38). Bu süreçte elde edilen yüksek enerjili elektronların daha sonra bir elektron taşıma zincirine katılarak bir dizi taşıyıcıdan geçmeleri, ATP sentezi ile kenetlenmiştir. Ayrıca, bu yüksek enerjili elektronlar $NADP^+$'yi, NADPH'a indirger.

Karanlık reaksiyonlarda, ışık reaksiyonlarında üretilen ATP ve NADPH, CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların sentezi için itici gücü oluşturur. Bulan Melvin Calvin'in adıyla **Calvin döngüsü** adı verilen reaksiyon döngüsüne, CO_2, birer birer eklenir ve karbohidratlar oluşur (Şekil 2.39). Calvin döngüsünde, sentezlenen her glukoz molekülü için 18 molekül ATP ve 12 NADPH tüketilir. Her bir $NADP^+$ molekülünü NADPH'a dönüştürmek için iki elektrona gereksinim vardır; böylece, bir molekül glukozu sentezi için yeterli miktarda NADPH üretiminde, 24 adet elektron, elektron taşıma zincirinden geçmelidir. Bu elektronlar, 12 molekül suyun altı molekül O_2'e dönüşümü ile elde edilir ki bu da, her bir glukoz molekülü için altı O_2 molekülü oluşumu ile tutarlıdır. Ancak, henüz tam olarak açık olmayan nokta, aynı 24 elektronun elektron taşıma zincirinden geçmesinin Calvin döngüsü için gerekli olan 18 ATP'yi üretmek için yeterli olup olmadığıdır. ATP moleküllerinden bazıları, güneş ışığının enerjisini NADPH sentezi yapmaksızın, yalnızca ATP sentezi yapan alternatif elektron taşıma zincirlerinde üretilebilir (bkz. Bölüm 10).



Şekil 2.38 Fotosentezin ışık reaksiyonları
Güneş ışığının enerjisi H_2O'yu O_2'e parçalamak için kullanılır. Bu reaksiyondan açığa çıkan yüksek-enerjili elektronlar daha sonra bir dizi taşıyıcıdan geçerek $NADP^+$'yi NADPH'a dönüştürmekte kullanılır. Elektron taşıma reaksiyonlarından sağlanan enerji aynı zamanda, ATP'nin sentezini de sürükler. Bu reaksiyonların ayrıntıları 10. Bölüm'de ele alınmıştır.



Şekil 2.39 Calvin döngüsü
Burada bir glukoz molekülünün altı adet CO_2 molekülünden sentezi gösterilmektedir. Her bir CO_2 molekülü ribuloz-1,5-bisfosfata eklenerek iki molekül 3-fosfogliserat oluşur. Bu altı CO_2 molekülü böylece, 12 molekül 3-fosfogliserat oluşumuna neden olur; bunlar da, 12 molekül ATP ve 12 molekül NADPH harcanarak, 12 molekül gliseraldahid-3-fosfata dönüşür. Daha sonra, iki molekül gliseraldehid-3-fosfat glukoz sentezi için kullanılır ve diğer on molekül Calvin döngüsünde devam ederek altı molekül ribuloz-5-fosfat oluşur. Döngü altı ilave ATP molekülünün ribuloz-1,5-bisfosfat oluşumu için kullanılması ile son bulur.

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi

Bir önceki bölüm, hücrenin ATP formundaki enerjiyi elde ettiği ve depoladığı temel metabolik reaksiyonları özetledi. Bu metabolik enerji daha sonra, makromoleküllerin ve diğer moleküllerin sentezi gibi çeşitli işleri yerine getirmek için kullanılır. Böylece, organik moleküllerin yıkılımından sağlanan enerji (katabolizma) hücrenin diğer gerekli komponentlerinin sentezi için kullanılır. Katabolik yolların çoğunluğu, hem enerji (ATP), hem de indirgeyici kuvvet (NADH) üretimi ile kenetlenmiş olan organik moleküllerin yükseltgenmesini içerir. Buna karşın, biyosentetik (anabolik) yollar genellikle hem ATP hem de indirgeyici kuvvet (genelde NADPH formunda) kullanılarak yeni organik bileşiklerinin sentezi ile ilişkilidir. Temel bir biyosentetik yol, fotosentezin karanlık reaksiyonlarında CO_2 ve H_2O'dan karbohidratların sentezi, bir önceki konuda tartışılmıştır. Temel hücre bileşenlerinin (karbohidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler) biyosentezi de izleyen konuda ele alınmıştır.

Karbohidratlar

Besin maddelerinden doğrudan elde edilmek veya fotosentez ile üretilmeye ek olarak, glukoz diğer organik moleküllerden sentezlenebilir. Hayvan hücrelerinde, glukoz sentezi (glukoneogenez), genelde laktat (anaerobik glikolizde oluşur), amino asitler (proteinlerin yıkılımından elde edilir) veya gliserol (lipidlerin yıklımı ile üretilir) ile başlar. Bitkiler (hayvanlar değil) glukozu yağ asitlerinden de

sentezleyebilirler – bu işlem tohumların filizlenmesi sırasında önemlidir zira yağlar olarak depolanan enerji karbohidratlara dönüştürülerek bitkinin büyümesini desteklemelidir. Hem hayvan hem de bitki hücrelerinde, basit şekerler polimerleştirilerek polisakkarid olarak depolanırlar.

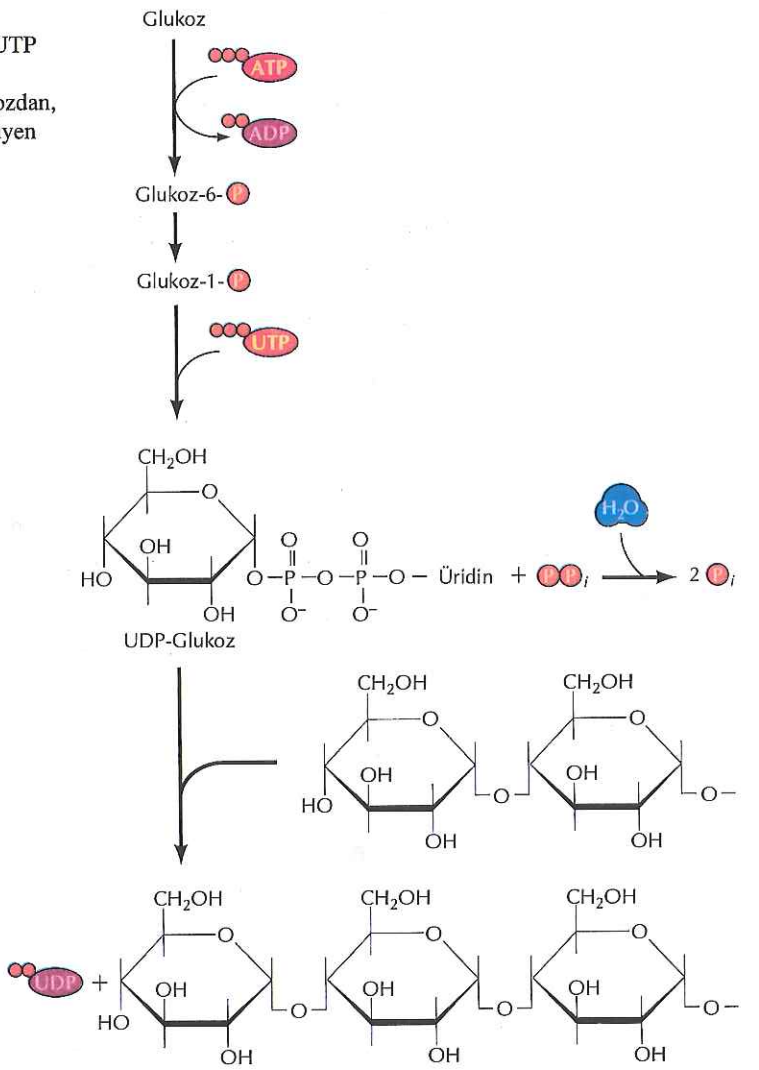
Glukoneogenez piruvatın glukoza dönüşümünü içerir -esansiyel olarak, glikolizin tersidir. Ancak, daha önce tartışıldığı gibi, glukozun piruvata glikolitik yoldan dönüşümü enerji serbestleştiren bir olaydır ve ATP ve NADH'dan ikişer molekül üretilir. Glikolizin bazı reaksiyonları kolayca geriye dönüşümlü ise de, bazıları yalnızca glukoz yıkılımı yönünde ilerler çünkü büyük miktarda serbest enerji düşüşü ile ilişkilidir. Glikolizin bu enerjetik olarak elverişli reaksiyonları, glukoneogenezde, (değişik enzimler tarafından katalizlenen) başka reaksiyonlar ile sağlanır ki bu reaksiyonlar, glukoz sentezi yönünde ilerleyebilmeleri için ATP ve NADH tüketimi ile kenetlenmişlerdir. Genelde, iki piruvat molekülünden glukoz sentezi dört adet ATP molekülü, iki GTP ve iki NADH gerektirir. Bu süreç, glikolizin basitçe tersine dönmesinden (iki molekül ATP ve iki molekül NADH gerektirecektir) çok daha masraflıdır; bu da, metabolik yolun biyosentez yönünde işletilmesi için gereken ilave enerjiyi gösterir.

Hem bitki hem de hayvan hücrelerinde, glukoz, polisakkarid olarak depolanır (sırasıyla, nişasta ve glikojen). Polisakkarid sentezi, tüm diğer makromoleküllerin sentezi gibi, enerji-gerektiren bir reaksiyondur. Önceden belirtildiği gibi, iki şekerin bir glikozidik bağ ile bağlanması, bir molekül suyun uzaklaştırıldığı (bkz. Şekil 2.3) bir dehidrasyon reaksiyonu olarak yazılabilir. Ancak, bu tür bir reaksiyon enerjetik olarak elverişsizdir ve doğru yönde ilerleyemez. Dolayısıyla, bir glikozidik bağın oluşumu, bir enerji üreten reaksiyon ile kenetlenmelidir ki bu, polisakkarid sentezinde, nükleotid şekerlerin ara bileşikler olarak kullanılmasıyla çözümlenir (Şekil 2.40). Glukoz, önce, bir ATP ile sürüklenen reaksiyonda glukoz-6-fosfata fosforillenir; o da glukoz-1-fosfata dönüşür. Glukoz-1-fosfat UTP (üridin trifosfat) ile reaksiyona girerek UDP-glukoz ve pirofosfat oluşturur; pirofosfat fosfata hidroliz olarak ek serbest enerji sağlar. UDP-glukoz, aktive edilmiş bir ara-bileşik olup, glukoz birimini büyüyen bir polisakkarid zincirine, enerjetik yönden elverişli bir reaksiyonda, aktarır. Böylece, ATP ve UTP'nin kimyasal enerjisi polisakkaridlerin basit şekerlerden sentezini destekler.

Lipidler

Lipidler önemli enerji depo molekülleri ve hücre zarlarının temel bileşenleridir. Karbohidratların yıkılımı ile üretilen Asetil CoA'dan, yağ asiti oksidasyonunun tersine benzeyen bir dizi reaksiyon ile sentezlenir. Ancak, karbohidrat sentezinde olduğu gibi, yağ asitlerin sentezine yol açan reaksiyonlar, yıkılımlarında söz konusu olan reaksiyonlardan farklıdır ve hem ATP formundaki enerji, hem de NADPH formundaki indirgeyici kuvvetin tüketimi ile kenetlenerek biyosentetik yönde ilerlerler. Yağ asitleri, asetil CoA'dan elde edilen iki-karbonlu birimlerin büyüyen bir zincire basamak basamak eklenmesi ile sentezlenir. Bu iki-karbonlu birimlerin her birinin eklenmesi, bir ATP molekülü ve iki NADPH molekülü gerektirir.

Yağ asiti biyosentezinin, ökaryotların sitozolinde bulunan temel ürünü 16-karbonlu yağ asiti palmitattır. Hücre zarlarının temel

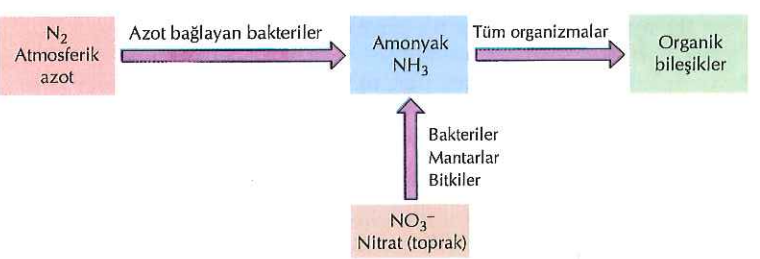


Şekil 2.40 Polisakkaridlerin sentezi
Glukoz önce, bir molekül ATP ve bir molekül UTP kullanılarak, aktif formu olan UDP-glukoza dönüştürülür. Bundan sonra, glukoz UDP-glukozdan, enerjetik olarak elverişli bir reaksiyon ile, büyüyen bir polisakkarid zincirine aktarılır.

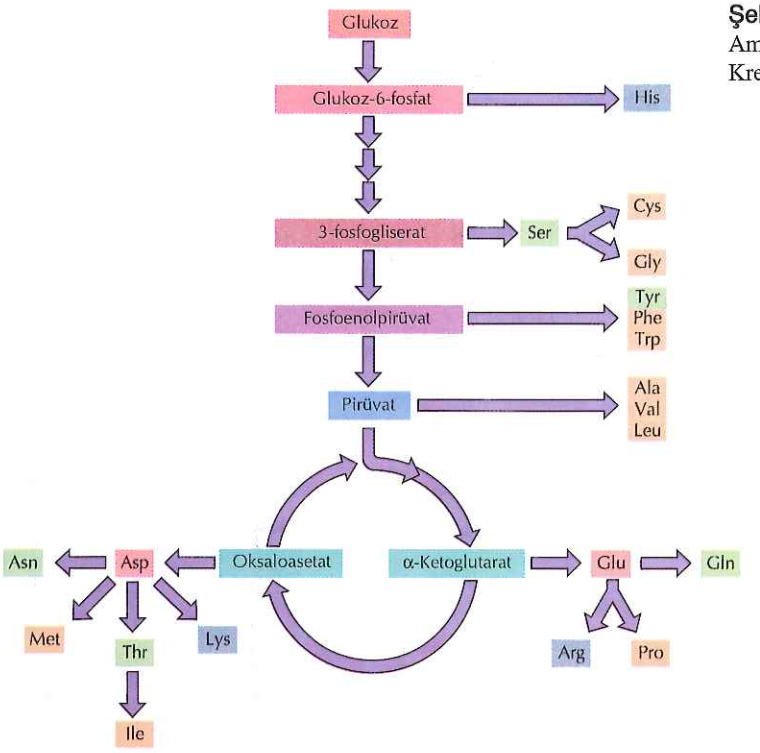
bileşenleri (fosfolipidler, sfingomyelin ve glikolipidler) bu serbest yağ asitlerinden, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtında sentezlenirler (bkz. Bölüm 9).

Proteinler

Karbohidratlar ve lipidlerden farklı olarak, nükleik asitler gibi proteinler de, karbon, hidrojen ve oksijene ilave olarak, azot içerirler. Azot, organik bileşiklere, farklı organizmaların farklı kaynaklarından



Şekil 2.41 Azotun organik bileşiklerin yapısına alınması
Amonyak, tüm organizmalar tarafından organik bileşiklerin yapısına alınabilmektedir. Bazı bakteriler atmosferin azotunu amonyağa dönüştürebilmektedir ve bakteri, mantar ve bitkilerin çoğunluğu topraktan nitratı kullanabilmektedir.



Şekil 2.42 Amino asitlerin biyosentezi
Amino asitlerin karbon iskeletleri glikoliz ve Krebs döngüsünün ara bileşiklerinden sağlanır.

dahil edilmektedir (Şekil 2.41). Bazı bakteriler, **azot bağlama** adı verilen bir işlemle atomosferin N_2'unu kullanabilmekte; N_2'u, ATP formundaki enerjinin harcanması ile NH_3'a indirgemektedir. Her ne kadar çok az bakteri türü azotu bağlayabilmekte ise de, bakterilerin çoğunluğu, mantarlar ve bitkiler, toprağın ortak bir bileşeni olan nitratı (NO_3^-) kullanarak, NADH veya NADPH'ın elektronları ile NH_3'a indirgeyebilmektedirler. Son olarak, tüm organizmalar amonyağı (NH_3) organik bileşiklerin yapısına katabilmektedirler.

NH_3 primer olarak glutamat ve glutamin amino asitlerinin (bu amino asitler, sitrik asit döngüsü ara bileşiği olan α-ketoglutarattan türerler) sentezi sırasında organik moleküllerin yapılarına alınmaktadır. Daha sonra, bu amino asitler, glikoliz ve sitrik asit döngüsü gibi (Şekil 2.42) merkezi metabolik yollardan köken alan diğer amino asitlerin sentezi sırasında amino grubu vericisi olarak işlev görürler. Amino asit sentezi için ham madde, böylece glukozdan sağlanır ve amino asitler, enerji (ATP) ve indirgeyici kuvvet (NADPH) harcanarak sentezlenirler. Birçok bakteri ve bitkiler, tüm 20 amino asiti sentezleyebilirler. Ancak, insanlar ve diğer memeliler gerekli amino asitlerin yalnızca yarısı kadarını sentezlerler; kalan kısmı besin kaynaklarından elde edilir (Tablo 2.2).

Amino asitlerin proteinleri oluşturmak üzere polimerleşmeleri de enerji gerektirir. Polisakkaridlerin sentezinde olduğu gibi, peptid bağının oluşumu bir dehidrasyon reaksiyonu olarak ele alınır ve bunun protein sentezi yönünde sürüklenebilmesi için bir başka metabolik enerji kaynağı ile kenetlenmesi gerekir. Polisakkaridlerin biyosentezinde, bu kenetlenme, şekerlerin, UDP-glukoz gibi aktif ara bileşiklere dönüştürülmesi ile gerçekleşir. Amino asitler de benzer olarak, protein sentezi için kullanılmalarından önce aktive edilirler.

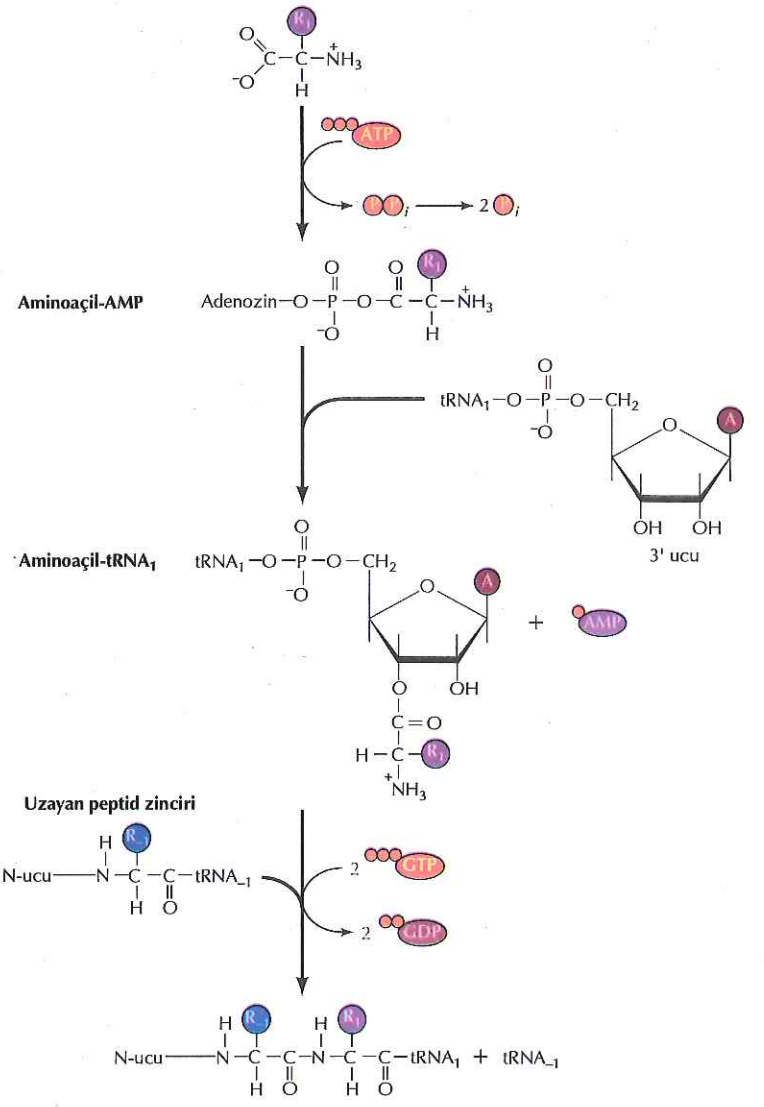
TABLO 2.2 İnsanlarda Amino Asit Diyetsel Gereksinimleri

Esansiyel	Esansiyel olmayan
Histidin	Alanin
İzolösin	Arjinin [a]
Lösin	Asparagin
Lizin	Aspartat
Metiyonin	Sistein
Fenilalanin	Glutamat
Treonin	Glutamin
Triptofan	Glisin
Valin	Prolin
	Serin
	Tirozin

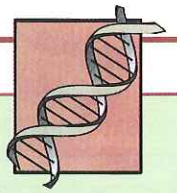
Esansiyel amino asitler diyetsel kaynaklardan sağlanmalıdır; nonesansiyel amino asitler insan hücreleri tarafından sentezlenebilirler.

[a] Her ne kadar arjinin esansiyel olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılırsa da, büyüme çağındaki çocuklar diyetle ilave arjinin almalıdırlar.

Protein biyosentezi ile polisakkarid biyosentezi arasındaki kritik bir farklılık, amino asitlerin, proteinlere, bir gen tarafından belirlenmiş özgün bir sıra ile katılmalarıdır. Gendeki nükleotidlerin dizilimi, translasyon sırasında, amino asitlerin dizilimini belirlemekte ve bu süreçte RNA (mRNA) protein sentezi için bir kalıp işlevi görmektedir (bkz. Bölüm 3). Her bir amino asit, önce, sepsifik bir transfer RNA (tRNA) molekülüne, ATP hidrolizi ile kenetlenen bir reaksiyonla bağlanmaktadır (Şekil 2.43). Daha sonra, aminoaçil transfer RNA'lar, ribizomlara bağlanmış olan mRNA kalıbı üzerinde dizilirler ve her bir amino asit, büyüyen peptidin C-ucuna, Bölüm 7'de ayrıntılı olarak ele alıncak olan bir dizi reaksiyonla eklenir. Bu işlem sırasında, iki ilave GTP molekülü hidroliz olmaktadır; böylece, her bir amino asitin proteinin yapısına alınması bir ATP ve iki GTP'nin hidrolizi ile kenetlenmiştir.



Şekil 2.43 Peptid bağının oluşması
Bir amino asit önce, kendi tRNA'sına, ATP'nin AMP'ye hidrolizini gerektiren, iki basamaklı bir reaksiyon ile bağlanarak aktifleşir. tRNAlar, amino asitleri, ribozomlara bağlanmış olan mRNA kalıpları üzerinde sıralamak için adaptör olarak işlev görürler. Her bir amino asit, daha sonra büyüyen peptidin C ucuna, iki ilave GTP molekülünün harcanmasıyla, aktarılır.



MOLEKÜLER TIP

Fenilketonüri

Hastalık

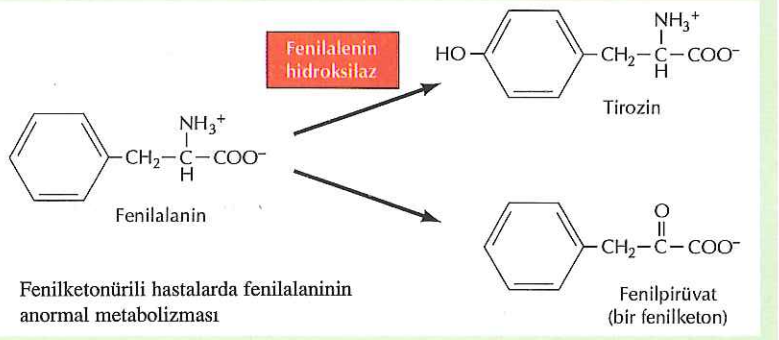
Fenilketonüri, ya da PKU, tahrip edici etkileri olan bir doğuştan amino asit metabolizma bozukluğudur. Yenidoğan bebeklerde 10,000 de bir sıklıkla görülür ve tedavi edilmezse, şiddetli mental gerilik ile sonuçlanır. Fenilketonüriden sorumlu olan bozukluğun anlaşılması, erken tanı ve efektif tedavi açısından yüz güldürücü olmuştur.

Moleküler ve Hücresel Temel

Fenilalanini tirozine dönüştüren hidroksilaz enziminin eksikliği fenilketonüriye yol açar. Bu eksiklik, fenilalaninin yüksek düzeylerde birikimine ve, fenilpiruvata dönüşme gibi başka reaksiyonlara girmesine neden olur. Fenilalanin, fenilpiruvat ve diğer anormal metabolitler kanda birikerek idrarda yüksek düzeylerde atılırlar (hastalığın adı, hastalıklı çocukların idrarlarında yüksek düzeylerde bulunan ve bir fenilketon bileşiği olan fenilpiruvattan gelmektedir). Kesin biyokimyasal neden bilinmemekle birlikte, mental gerilik bu anormal fenilalanin metabolitlerinin birikiminin kritik bir sonucudur.

Önlem ve Tedavi

Enzim eksikliği, fötus uterusta iken sorun yaratmamaktadır; dolayısıyla, fenilketonürili çocuklar normal olarak doğarlar. Ancak, tedavi edilmezlerse, hastalıklı çocuklarda, birinci yıllarında, şiddetli ve kalıcı mental gerilik yerleşir. Yüz güldürücü bir durum, yenidoğanlarda, kanda fenilalaninin artışını saptayabilen rutin tarama testleri ile hastalığın kolayca tanımlanabilmesidir. Hastalıklı bebeklerin fenilalaninden fakir bir sentetik diyet ile beslenmeleri ile mental gerilik engellenebilmektedir. Bu diyetsel tedavi, aksi taktirde kalıcı mental geriliğe yol açacak olan toksik fenilalanin metabolitlerinin birikimini engelleyerek etkin biçimde hastalığı tedavi etmektedir. Böylece, tüm yenidoğan bebeklerde fenilketonüri için rutin tarama, kritik bir test olmaktadır.

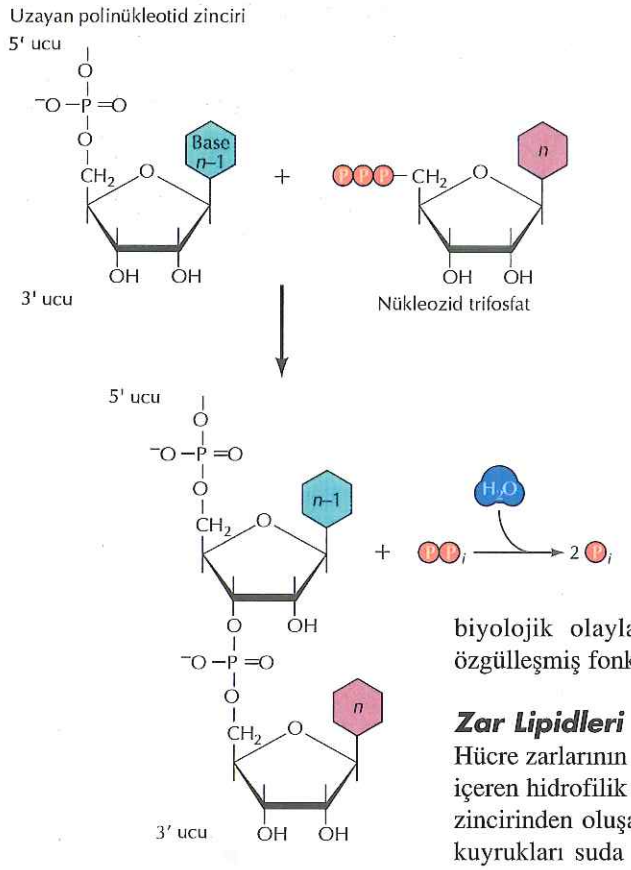


Fenilketonürili hastalarda fenilalaninin anormal metabolizması

Nükleik Asitler

Nükleik asitlerin öncül maddeleri olan nükleotidler, nükleik asit bazlarına bağlı, fosforillenmiş beş-karbonlu şekerlerden oluşurlar. Nükleotidler karbohidratlardan ve amino asitlerden sentezlenebilirler; aynı zamanda, besin kaynaklarından elde edilebilirler ya da, nükleik asit yıkılımı sonrasında tekrar kullanılabilirler. Nükleotid biyosentezi için başlangıç noktası fosforillenmiş şeker olan riboz-5-fosfattır ki bu, glukoz-6-fosfattan türer. Sonra, ayrılan yollarda, pürin ya da pirimidin ribonükleotidlerinin sentezi gerçekleşir ki bu moleküller, RNA sentezi için en yakın ön maddelerdir. Bu ribonükleotidler, DNA'nın monomerik yapı taşları olan deoksiribonükleotidlere dönüştürülürler.

RNA ve DNA nükleozid monofosfatların polimerleridir. Ancak, diğer makromoleküller için geçerli olan doğrudan polimerleşme, nükleozid monofosfatlar için enerjetik yönden elverişli değidir ve bu nedenle, oligonükleotidlerin sentezinde nükleozid trifosfatlar aktif öncüler olarak kullanılır (Şekil 2.44). Bir nükleozid 5'-trifosfat, büyüyen bir polinükleotid zincirinin 3' hidroksil grubuna eklenir; pirofosfat grubu serbestleşip ayrışarak, reaksiyonu polinükleotid sentezi yönünde iter.



Şekil 2.44 Polinükleotidlerin sentezi
Nükleozid trifosfatlar, büyüyen bir polinükleotidin 3' ucuna bağlanırlar ve bir pirofosfat serbestleşir.

Hücre Zarları

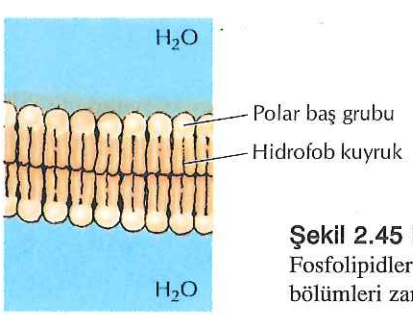
Hücrelerin yapı ve işlevleri zarlara sıkıca bağlıdır; zarlar yalnızca hücrenin içini çevresinden ayırmakla kalmazlar; aynı zamanda, ökaryot hücrelerin, nükleus ve sitoplazmik organeller dahil olmak üzere, iç bölümlerini belirler. Biyolojik zarların oluşumu lipidlerin özelliklerine dayalıdır ve her hücre zarı ortak bir yapısal düzen içindedir: proteinlerle ilişkili fosfolipid çift-tabakaları. Bu zar proteinleri birçok özgülleşmiş fonksiyondan sorumludur; bazıları, hücrelerin dış uyaranlara yanıt vermesini sağlayan reseptörler olarak davranırlar; bazıları zarın bir ucundan diğerine moleküllerin seçili transportunu sağlarlar ve diğerleri elektron taşınımı ve oksidatif fosforilasyona katılır. Buna ilave olarak, zar proteinleri çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki etkileşimleri kontrol ederler. Böylece, zarların ortak yapısal organizasyonları çok çeşitli biyolojik olaylara ve daha ilerki bölümlerde görüleceği üzere, özgülleşmiş fonksiyonlara zemin yaratır.

Zar Lipidleri

Hücre zarlarının temel yapı taşları fosfolipidlerdir: fosfolipidler, fosfat içeren hidrofilik bir baş kısma bağlanmış iki adet hidrofobik yağ asiti zincirinden oluşan amfipatik moleküllerdir (bkz. Şekil 2.7). Yağ asiti kuyrukları suda zayıf çözünürlüğe sahip olduklarından, fosfolipidler sulu çözeltilerde kendiliğinden çift-tabaka oluştururlar; hidrofobik kuyruk kısımlar zarın iç bölümüne gömülüdür ve de polar baş kısımlar, zarın her iki yüzeyinde, su ile temas halindedir (Şekil 2.45). Bu **fosfolipid çift-tabakalar,** iki sulu kompartman arasında kararlı bir bariyer oluşturur ve tüm biyolojik zarların temel yapısını simgeler.

Lipidler hücre zarlarının çoğunluğunun kütlesinin takriben %50'sini oluşturur; ancak bu oran, zarın türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin, plazma zarları, takriben %50 lipid ve %50 proteinden oluşur. Diğer taraftan, mitokondrinin iç zarı, sıkça rastlanmayan yüksek bir protein oranı (%75 civarında) gösterir ki bu, elektron taşıma ve oksidatif fosforilasyonla ilişkili protein komplekslerinin bolluğunu yansıtır. Değişik hücre zarlarının da lipid bileşimi farklılıklar gösterir (Tablo 2.3). E.coli'nin plazma zarları çoğunlukla, total lipidin %80'ini oluşturan fosfatidiletanolaminden ibarettir. Memelilerin plazma zarları daha komplekstir; dört temel fosfolipid içerirler -fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ve sfingomiyelin- ki bunlar birlikte, total zar lipidinin %50-60'ını oluştururlar. Fosfolipidlere ilave olarak, hayvan hücrelerinin plazma zarları glikolipid ve kolesterol içerir ki bunlar total lipid moleküllerinin %40 civarına karşılık gelir.

Lipid çift-tabakalarının önemli bir özelliği, moleküllerin her birinin (hem lipidler hem de proteinler) dönmeleri ve yana doğru hareket



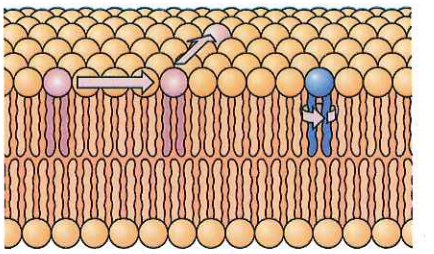
Şekil 2.45 Bir fosfolipid çift tabaka
Fosfolipidler kendiliğinden, polar baş kısımları su ile temasta, hidrofobik kuyruk bölümleri zarın içine gömülü olarak, kararlı çift-tabakalar oluştururlar.

TABLO 2.3 Zarların Lipid Bileşimleri [a]

Lipid	Plazma zarı		Kaba endoplazmik retikulum	Dış mitokondrial zarlar
	E.coli	Eritrosit		
Fosfatidilkolin	0	17	55	50
Fosfatidilserin	0	6	3	2
Fosfatidiletanolamin	80	16	16	23
Sfingomiyelin	0	17	3	5
Glikolipidler	0	2	0	0
Kolesterol	0	45	6	<5

Kaynak: P.L. Yeagle'ın bulguları, 1993. *The Membranes of Cells*, 2.baskı, San Diego, CA: Academic Press.

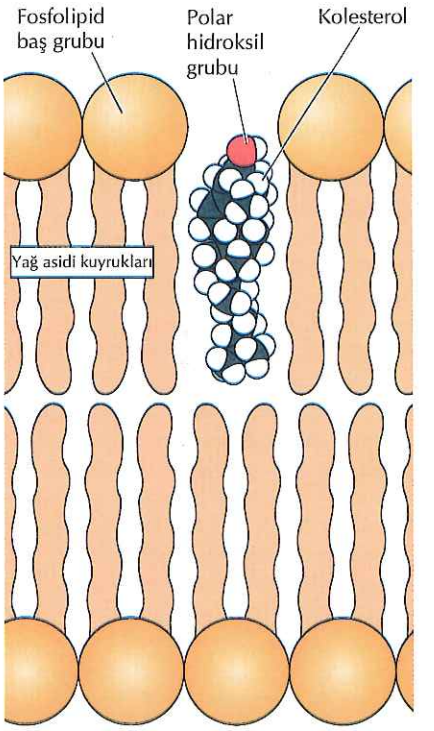
[a] Zar bileşimleri, temel lipid bileşenlerinin mol yüzdeleri olarak belirtilmiştir.



Şekil 2.46 Bir zarda fosfolipidlerin hareketleri
Fosfolipidler, bir çift-tabakanın içinde, tek tek, dönebilirler ya da yanlara doğru hareket edebilirler.

etmeleri için serbestlik sağlayan iki-boyutlu sıvı olmalarıdır (Şekil 2.46). Bu akışkanlık, zarların çok önemli bir özelliğidir ve hem sıcaklık, hem de lipid bileşimi ile belirlenir. Örneğin, kısa zincirli yağ asitleri arasındaki etkileşim, uzun zincirli yağ asitleri arasındaki etkileşimlerden daha zayıftır; böylece, daha çok kısa zincirli yağ asiti içeren zarlar, daha az katı olup daha düşük sıcaklıklarda sıvı olarak kalabilirler. Doymamış yağ asitleri içeren lipidler benzer olarak zarın akışkanlığını artırırlar, çünkü çift bağların varlığı yağ asiti zincirlerinde bükülmeler oluşturur ve bu da paketlenmeyi zorlaştırır.

Hidrokarbon halka yapısı nedeniyle (bkz. Şekil 2.9), kolesterol, zar akışkanlığını belirlemede belirgin bir role sahiptir. Kolesterol molekülleri, polar hidroksil grupları ile, fosfolipidlerin polar baş kısımlarının yakınından çift-tabakaya katılırlar (Şekil 2.47). Bu nedenle, kolesterolün katı hidrokarbon halkaları, fosfolipid baş kısımlara komşu olan yağ asiti zincirleri ile etkileşime girerler. Bu etkileşim, yağ asiti zincirlerinin dış kısımlarının mobilitesini azatarak zarın bu kısmını daha katı bir duruma getirir. Diğer taraftan, kolesterolün yapıya katılımı yağ asiti zincirleri arasındaki etkileşimleri engelleyerek, daha düşük sıcaklıklarda zar akışkanlığına izin verir.

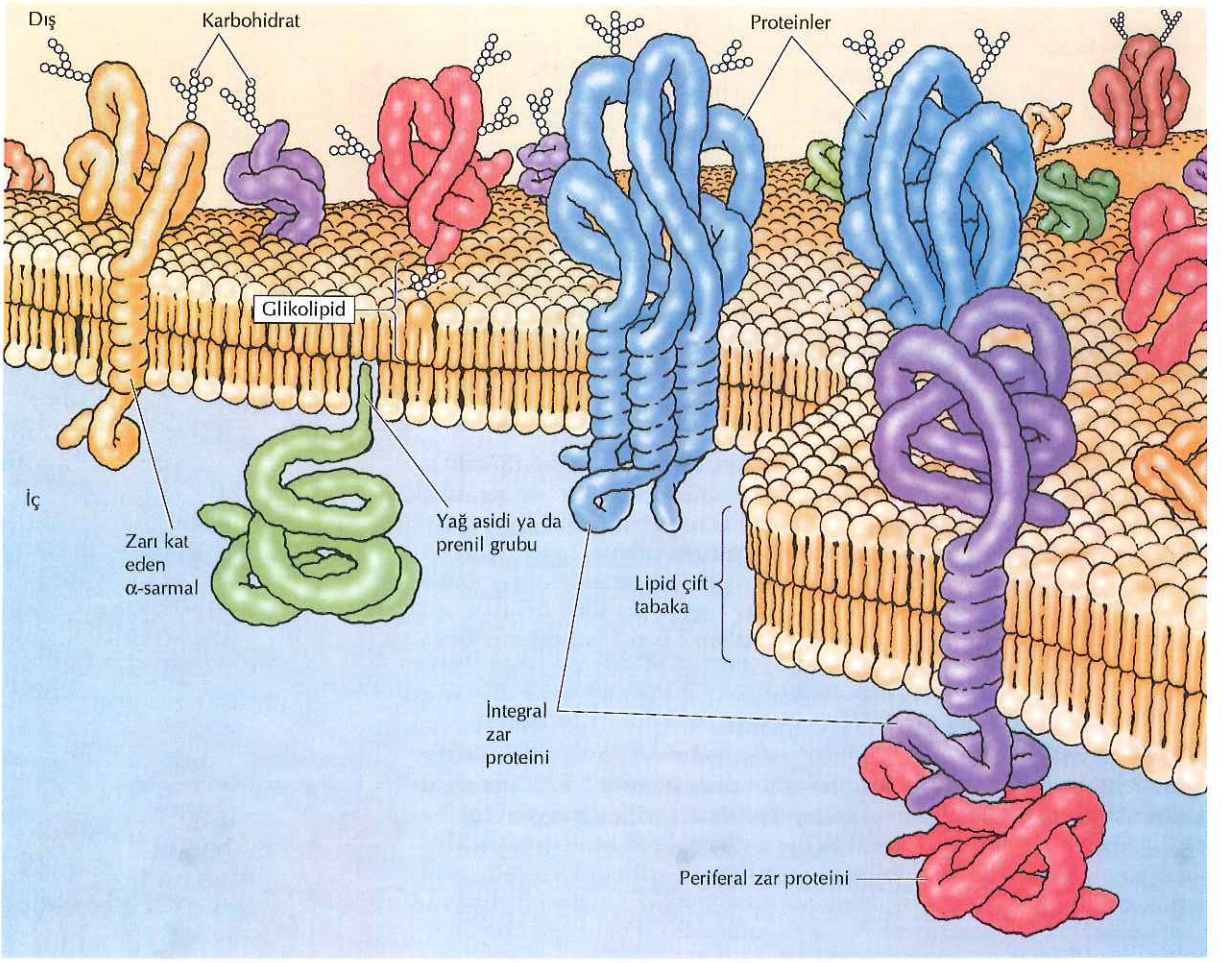


Şekil 2.47 Bir zarın içine kolesterolün katılımı
Kolesterol, polar hidroksil grubu, fosfolipidlerin polar baş kısımları ile yakın olacak şekilde, zarın içine katılır.

Zar Proteinleri

Proteinler hücre zarlarının diğer temel bileşenleri olup, hücrenin değişik zarlarının kütlesinin %25 - %75'ini oluşturur. Jonathan Singer ve Garth Nicolson tarafından 1972'de tasarlanan güncel zar yapısında, zarlar, proteinlerin bir lipid çift-tabakanın içine gömüldükleri bir **akışkan mozaik** modeli olarak gösterilmektedir (Şekil 2.48). Fosfolipidler zarların temel yapısal düzenini oluştururken, zar proteinleri hücrenin değişik zarlarının özgül işlevlerini yerine getirmektedir. Bu proteinler, zarla ilişkilerine göre iki temel sınıfta toplanırlar. **İntegral zar proteinleri** lipid çift-tabakanın içine doğrudan gömülmüşlerdir. **Periferal zar proteinleri** lipid çift-tabakanın içine gömülmezler fakat zarla indirekt olarak, genelde integral zar proteinleri ile etkileşimler yoluyla, ilişkilidirler.

İntegral zar proteinlerinin çoğu (**transmembran proteinler** de denilmektedir) lipid çift-tabaka boyunca uzanırlar; zarın her iki yüzünde de bölümleri vardır. Bu proteinlerin zarın içinde uzanan bölümleri genellikle 20-25 nonpolar amino asit içeren α-sarmal bölgeleridir. Bu amino asitlerin hidrofobik yan zincirleri, zar lipidlerinin yağ asiti zincirleri ile etkileşime girer ve de, α-sarmalın



Şekil 2.48 Zar yapısının akışkan mozaik modeli
Biyolojik zarlar, bir çift-tabaka içine gömülü proteinlerden oluşmaktadır. İntegral zar proteinleri, genelde, 20-25 hidrofobik amino asitlik α-sarmal bölgeleri ile, zarın içinde gömülüdür. Bazı transmembran proteinler zarı bir kez geçerler; diğerleri, birden fazla zarı geçen bölüme sahiptir. Buna ilave olarak, bazı proteinler, zara, polipeptid zincirlerine kovalent olarak bağlı lipidler tarafından tutunurlar. Bu proteinler, plazma zarının hücre dışı yüzüne glikolipidler ile, sitozolik yüzüne de, yağ asitleri ya da prenil gruplar ile tutunurlar (yapılar için Bölüm 7'ye bakınız). Periferal zar proteinleri, zarın içine gömülü olmayıp, integral zar proteinleri ile etkileşimler yoluyla bağlanırlar.

oluşması, bu bölümde daha önce protein katlanması ile ilgili olarak açıklandığı gibi, peptid bağlarının polar karakterini nötralize eder. Lipid çift-tabakaları geçen tek diğer protein yapısı olarak, β-tabakaların fıçıya benzer bir yapı oluşturdukları **β-fıçı** yapısı bilinmektedir ki bu yapı, bakteri, kloroplastlar ve mitokondrilerin transmembran proteinlerinde görülmektedir (Şekil 2.49). Fosfolipidler gibi, transmembran proteinler, hidrofilik kısımları zarın her iki yüzeyindeki sulu ortamlar ile iç içe olan amfipatik moleküllerdir. Bazı transmembran proteinler zarı yalnızca bir kez geçmektedir; diğerlerinin, zarı geçen çok sayıda bölgeleri vardır. Ökaryot plazma zarlarının transmembran proteinlerinin çoğu, karbohidratların bağlanmasıyla modifiye olmuşlardır; bu karbohidratlar, hücrenin dışı ile ilişkilidir ve hücre-hücre etkileşimlerine katılabilirler.

Proteinler aynı zamanda, polipeptid zincirlerine kovalent olarak bağlanan lipidler tarafından da zarlara tutunurlar (bkz. Bölüm 7). Belirli lipid modifikasyonları, proteinleri, plazma zarının sitozolik ve hücre dışı yüzüne tutundurur. Proteinler, zarın sitozolik yüzüne, ya 14-karbonlu bir yağ asitinin (miristik asit) N-ucuna, ya da 16-karbonlu bir yağ asiti (palmitik asit), veya 15-20-karbonlu prenil gruplarının sistein birimlerinin yan zincirlerine eklenmeleriyle tutunurlar. Alternatif olarak, proteinler plazma zarının hücre dışı yüzüne, karboksi uçlarına glikolipidlerin bağlanmasıyla tutunurlar.

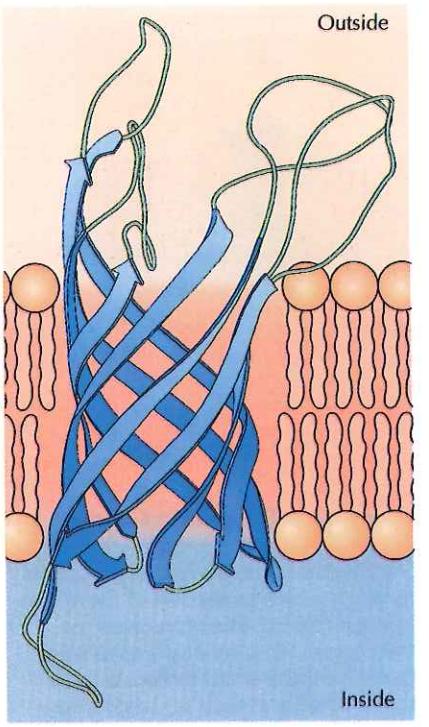
Hücre Zarlarından Taşıma

Biyolojik zarların küçük moleküllere seçici geçirgenliği, hücreye iç bileşimini kontrol etme ve sürdürme olanağını vermektedir. Fofolipid çift-tabakadan yalnızca küçük ve yüksüz moleküller serbestçe geçebilir (Şekil 2.50). O_2 ve CO_2 gibi küçük nonpolar moleküller lipid çift-tabakada çözünürler ve dolayısıyla hücre zarlarını rahatça geçerler. H_2O gibi, küçük, yüksüz ve polar moleküller de zarları geçebilirler; ancak, glukoz gibi büyük, yüksüz polar moleküller geçemez. İyonlar gibi yüklü moleküller, büyüklüklükleri ne olursa olsun, fosfolipid çift-tabakayı geçemez; H^+ iyonları bile serbest difüzyon ile lipid çift-tabakayı geçemez.

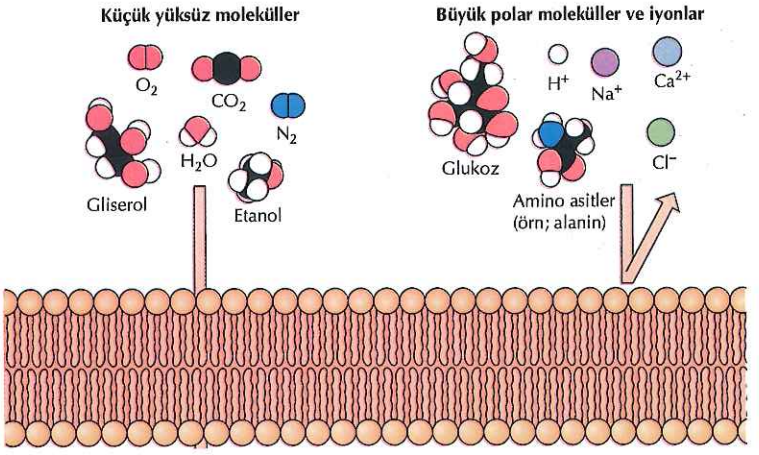
Her nekadar iyonlar ve polar moleküllerin çoğunluğu lipid çift-tabakadan difüze olamazlarsa da, bu tür birçok molekül (glukoz gibi) hücre zarlarını geçebilmektedir. Bu moleküller, zarları, taşıyıcı adı verilen özgül transmembran proteinlerinin etkisiyle geçerler. Bu tür taşıma proteinleri hücre zarlarının seçici geçirgenliğini belirleyerek zar fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Çok sayıda zarı geçen bölgeleri ile lipid çift-tabakada bir geçit oluştururlar ve polar veya yüklü moleküllerin, zar fosfolipidlerinin hidrofobik yağ asidi zincirleriyle etkileşime girmeksizin, bir protein deliğinden geçmelerine olanak tanırlar.

Bölüm 12'de ayrıntılı biçimde ele alındığı gibi, zar taşıyıcı proteinlerinin iki genel sınıfı mevcuttur (Şekil 2.51). **Kanal proteinleri,** zar boyunca açık geçitler oluştururlar ve uygun büyüklükteki herhangi bir molekülün geçmesine olanak verirler. Örneğin, iyon kanalları Na^+, K^+, Ca^{2+} ve Cl^- gibi inorganik iyonların plazma zarından geçmesine izin verirler. Kanal proteinleri açıldığında, uygun büyüklükte ve yükte olan iyonların serbest difüzyon ile geçebilecekleri küçük geçitler oluştururlar. Bu kanal proteinleri tarafından oluşturulan geçitler sürekli biçimde açık değildir; daha ziyada, hücre dışı sinyallere bağlı olarak seçilimli açılır ve kapanırlar; böylece hücrenin, iyonların zarlardan geçişlerini kontrol etmesine olanak tanırlar. Bu tür kontrollü iyon kanalları, elektrokimyasal sinyallarin iletilmesine aracı oldukları sinir ve kas hücrelerinde özellikle iyi incelenmiş durumdadır.

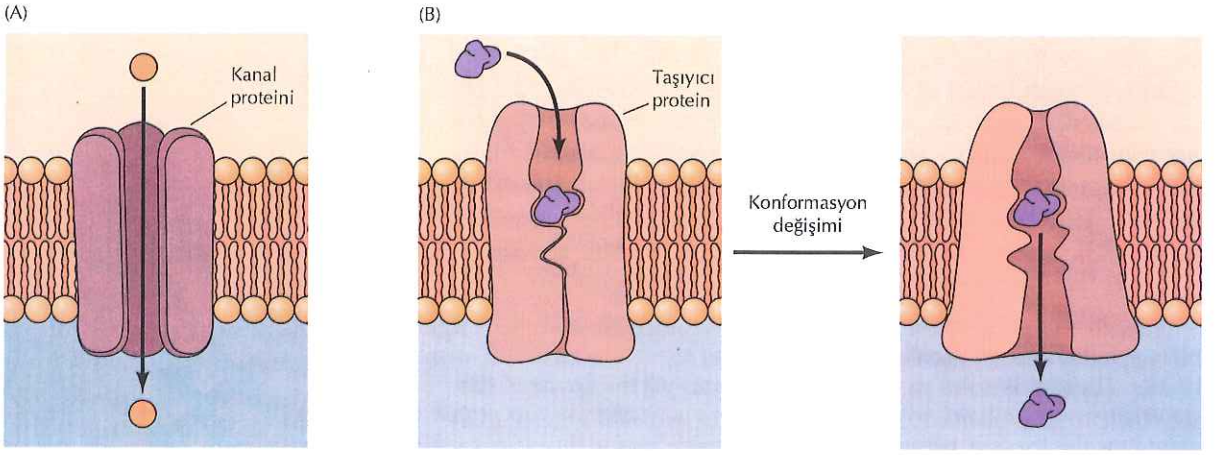
Kanal proteinlere zıt olarak, **taşıyıcı proteinler,** glukoz gibi küçük molekülleri seçici olarak bağlayarak taşırlar. Açık kanallar



Şekil 2.49 β-fıçı yapısının organizasyonu
Bazı transmemran proteinler fosfolipid çift-tabakayı, fıçıya benzer bir yapıya katlanmış olan β-tabakalar ile geçer.



Şekil 2.50 Fosfolipid çift-tabakaların geçirgenliği
Küçük yüksüz moleküller fosfolipid çift-tabakadan serbestçe difüze olabilirler. Ancak, çift-tabaka, daha büyük polar moleküllere (örn., glukoz ve amino asitler) ve iyonlara geçirgen değildir.

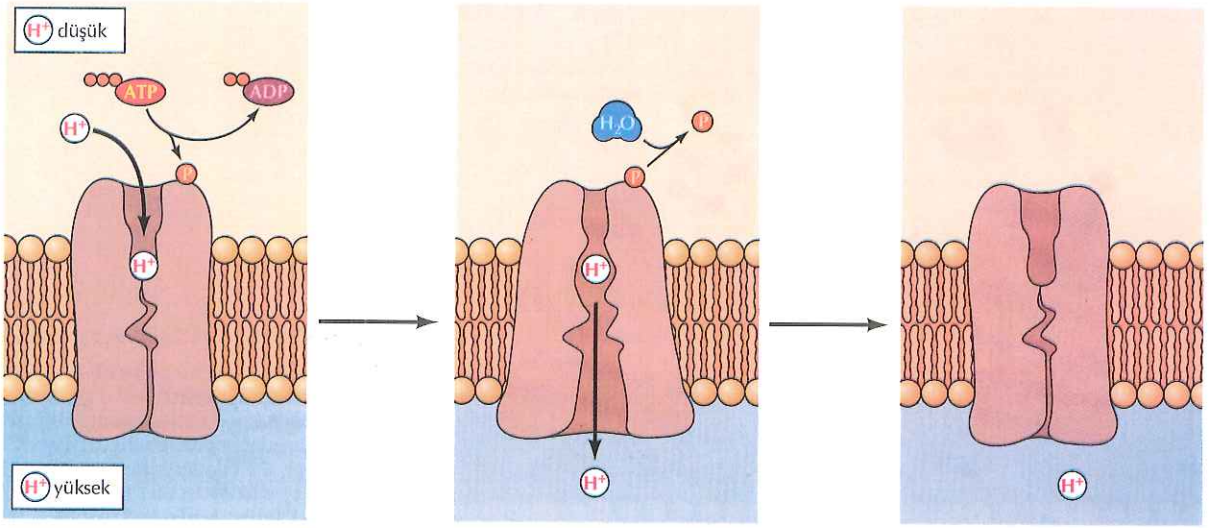


Şekil 2.51 Kanal ve taşıyıcı proteinler
(A) Kanal proteinleri, uygun büyüklükteki moleküllerin (örn., iyonlar) rahatça zarı geçebileceği açık porlar oluştururlar. (B) Taşıyıcı proteinler seçili olarak taşınacak küçük molekülü bağladıktan sonra, bir konformasyonel değişiklik geçirerek, molekülü zarın diğer tarafına serbestleştirirler.

oluşturmaktan ziyade, taşıyıcı enzimler gibi davranarak spesifik moleküllerin zarlardan geçişlerini kolaylaştırırlar. Özellikle, taşıyıcı proteinler spesifik moleküllere bağlandıklarında konformasyonal değişikliğe uğrayarak moleküllerin zarın bir tarafından diğer tarafına taşınacağı ve diğer tarafta serbestleştirileceği kanallar oluştururlar.

Şu ana kadar tanımlandığı kadar, gerek kanal, gerekse taşıyıcı proteinlerle moleküller, enerjetik olarak elverişli yönde zarları geçerler ki bu, konsantrasyon ve elektrokimyasal gradientlerle belirlenmektedir; bu süreç **pasif taşıma** adını alır. Ancak, taşıyıcı proteinler, zar boyunca taşınan moleküllerle ilişkili enerji değişikliklerini, başka metabolik enerji formlarının kullanımı ya da üretimi ile kenetleyen bir mekanizma oluşturabilirler -enzimatik reaksiyonların ATP hidrolizi ya da sentezine kenetlendiği gibi.

Şekil 2.52 Aktif taşıma modeli
ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerji, H^+'u, konsantrasyon gradientinin ters yönünde (düşük H^+ konsantrasyonundan yüksek konsantrasyona) taşımak için kullanılır. H^+ in bağlanmasından sonra, taşıyıcı protein fosforillenir ve bu, konformasyonel değişikliği indükler ki, elektrokimyasal gradiente ters yönde H^+ taşınması gerçekleşir. H^+'in serbestleşmesi ve bağlı fosfat grubunun hidrolizi, taşıyıcıyı başlangıç haline dönüştürür.



Örneğin, zarın bir yüzünden diğer yüzüne moleküller, enerjetik olarak elverişsiz bir yönde taşınabilir (örn, konsantrasyon gradiyentine ters yönde)-eğer, bu yöndeki taşınımları enerji kaynağı olarak ATP hidrolizine kenetlenmiş ise – işte bu işleme **aktif taşıma** adı verilir (Şekil 2.52). ATP olarak depolanmış olan serbest enerji, hücre bileşenlerinin sentezini sürüklemek için kullanıldığı gibi, bu şekilde, hücrenin iç bileşimini kontrol etmek için de kullanılabilmektedir.

ÖZET

HÜCRELERİN MOLEKÜLER BİLEŞİMİ

Karbohidratlar: Karbohidratlar, basit şekerleri ve polisakkaridleri içerirler. Polisakkaridler şekerlerin depo formları, hücrelerin yapısal bileşenleri ve hücre tanıma süreçlerinde belirteç olarak işlev görürler.

Lipidler: Lipidler hücre zarlarının temel komponentleridir ve enerji depo ve sinyal molekülleri olarak işlev görürler. Fosfolipidler hidrofilik bir fosfat içeren baş kısma bağlanmış iki hidrofobik yağ asiti zincirini içerir.

Nükleik Asitler: Nükleik asitler hücrenin temel bilgi molekülleridir. Hem DNA hem de RNA pürin ve pirimidin nükleotidlerinin polimerleridir. Komplemanter baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlanma, nükleik asitlere, kendi kendini kopyalamayı yönetme özelliğini verir.

Proteinler: Proteinler, her biri, spesifik kimyasal özellikleri olan ayrı yan zincir taşıyan 20 değişik amino asitin polimerleridir. Her bir proteinin belirli bir amino asit dizilimi vardır ki bu, üç-boyutlu yapısını belirler. Proteinlerin çoğunluğunda, α sarmallar ve β tabakalar globüler bölgelere katlanırlar ve hidrofobik amino asitler iç kısımda, hidrofilik amino asitler yüzeyde yerleşim gösterirler.

ENZİMLERİN BİYOLOJİK KATALİZÖRLER OLARAK MERKEZİ ROLLERİ

Enzimlerin Katalitik Aktiviteleri: Hücre içindeki hemen tüm kimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenirler.

Enzimatik Kataliz Mekanizması: Enzimler reaksiyon hızlarını şu şekilde artırırlar: sübstratları, uygun pozisyonda bağlayarak, sübstratların konformasyonlarını değiştirmek suretiyle geçiş durumuna yaklaştırarak ve kimyasal reaksiyonlara doğrudan katılarak.

Koenzimler: Koenzimler enzimlerle birlikte çalışarak sübstratlar arasında kimyasal grupları taşırlar

Enzim Aktivitesinin Regülasyonu: Enzimlerin aktiviteleri hücrenin fizyolojik gereksinimlerini karşılamak üzere kontrol edilir. Enzim aktivitesi şu şekillerde kontrol edilebilir: küçük moleküllerin bağlanması, başka proteinlerle etkileşim ve kovalent modifikasyonlar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

karbohidrat, monosakkarid, glikozidik bağ, oligosakkarid, polisakkarid, glikojen, nişasta, sellüloz

lipid,yağ asiti, triaçilgliserol, yağ, fosfolipid, sfingomyelin, amfipatik, glikolipid, kolesterol, steroid hormon

deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), mesajcı RNA (mRNA), ribozomal RNA, taşıyıcı RNA, nükleotid, pürin, pirimidin, adenin, guanin, sitozin, timin, urasil, 2'-deoksiriboz, riboz, nükleozid, fosfodiester bağı, oligonükleotid, polinükleotid

protein, aminoasit, peptid bağı, polipeptid, X-ışınları kristallografisi, birincil yapı, ikincil yapı, α-sarmal, β tabaka, üçüncül yapı, bölge (domeyn), dördüncül yapı

enzim, sübstrat, ürün, geçiş durumu, aktivasyon enerjisi, aktif bölge

anahtar-kilit modeli, indüklenmiş uyum

prostetik grup, koenzim, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)

geriye tepki inhibisyonu (feedback inhibisyon), allosterik regülasyon, fosforillenme

METABOLİK ENERJİ

Gibbs serbest enerjisi(G), adenozin 5'-trifosfat(ATP), yüksek-enerjili bağ

Serbest Enerji ve ATP: ATP, serbest enerji deposu olarak işlev yapar; bu da, hücrelerde enerji gerektiren reaksiyonlar için itici güç oluşturur.

glikoliz, koenzim A(CoA), sitrik asit döngüsü, Krebs döngüsü, flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$), oksidatif fosforilasyon, elektron transport zinciri

Glukozdan ATP Üretimi: Glukozun yıkılımı hücresel enrjinin büyük bir kısmını sağlar. Aerobik hücrelerde, glukozun tam oksidasyonu ile 36-38 molekül ATP üretilir. Bu ATP'nin çoğu, O_2'in H_2O'ya indirgendiği elektron transport zincirinde elde edilir.

Başka Organik Moleküllerden Enerji Üretimi: ATP aynı zamanda glukoz dışında organik moleküllerin yıkılımından da sağlanabilir. Yağlar karbohidratlara göre daha indirgenmiş olduklarından, daha verimli bir enerji deposu sağlarlar.

ışık reaksiyonları, karanlık reaksiyonlar, fotosentetik pigment(boya), klorofil, Calvin döngüsü

Fotosentez: Organik moleküllerin sentezi için gereken enerji, en uçta, bitkiler ve fotosentetik bakteriler tarafından yakalanan güneş ışığından türetilir. Fotosentezin ilk evresinde, güneş ışığının enerjisi ATP ve NADPH'ın sentezini sürüklemek için kullanılır; bu, H_2O'nin O_2'e yükseltgenmesi ile kenetlenmiştir. Bu reaksiyonlarda açığa çıkan ATP ve NADPH daha sonra, CO_2 ve H_2O'dan glukoz sentezinde kullanılır.

HÜCRE BİLEŞENLERİNİN BİYOSENTEZİ

glukoneogenez

Karbohidratlar: Glukoz, diğer organik moleküllerden, enerji ve indirgeyici kuvvet olarak, sırasıyla, ATP ve NADH'ın kullanılması ile sentezlenebilir. Basit şekerlerden polisakkaridlerin sentezi için ilave ATP'ye gereksinim vardır.

Lipidler: Lipidler, karbohidratların yıkılımından elde edilen asetil CoA'dan sentezlenir.

azot bağlama

Proteinler: Amino asitler, glikoliz ve sitrik asit döngüsünün ara bileşiklerinden sentezlenirler. Proteinleri oluşturmak üzere polimerleşmeleri, ATP ve GTP formunda ilave enerji gerektirir.

Nükleik Asitler: Pürin ve pirimidin nükleotidleri, karbohidratlardan ve amino asitlerden sentezlenir. DNA ve RNA'ya polimerleşmeleri aktif öncüler olarak nükleozid trifosfatların kullanımı ile mümkün olur.

HÜCRE ZARLARI

fosfolipid çift-tabaka

Zar Lipidleri: Tüm hücre zarlarının temel yapısı bir fosfolipid çift-tabakadır. Hayvan hücrelerinin zarları ayrıca glikolipidler ve kolesterol içerir.

akışkan mozaik modeli, integral zar proteini, transmembran protein, β-fıçı

Zar Proteinleri: Proteinler ya lipid çift-tabakanın yapısına girerler, ya da, zar ile indirekt olarak, protein-protein etkileşimleri ile, ilişkilidirler.

kanal proteini, taşıyıcı protein, pasif taşıma, aktif taşıma

Hücre Zarlarından Taşıma: Lipid çift-tabakalar yalnızca küçük yüksüz moleküllere geçirgendir. İyonlar ve polar moleküllerin çoğunluğu hücre zarlarından spesifik transport proteinleri ile taşınırlar; bu olay, ATP'nin hidroliz ya da sentezi ile kenetlenebilir.

Sorular

1. Suyun hangi özellikleri onu hücreler için en çok bulunan molekül olarak ideal yapmıştır?

2. Bir oligosakkarid ile bir polisakkarid arasındaki farklılık nedir?

3. Glikojen ile sellüloz arasındaki farklılık nedir?

4. Bir yağ asiti, yağdan nasıl farklıdır?

5. Hücrelerde yağların ve fosfolipidlerin temel fonksiyonları nelerdir?

6. Nükleik asitlerin yapı taşları olmalarının yanısıra, nükleotidlerin hücrelerde başka fonksiyonları nelerdir?

7. Non-polar amino asitleri tanımlayınız ve tipik, monomerik suda çözünür bir enzimin yapısındaki yerleşimlerini açıklayınız.

8. Tripsinin bağlama cebinde bir aspartat yer almaktadır. Bu amino asitin lizinle yer değiştirmesi sizce enzim aktivitesini nasıl etkeleyecektir?

9. A $\rightleftarrows$ B + C reaksiyonunda, $\Delta G^{\circ\prime}$ = +3.5 kcal/moldür. A'nın konsantrasyonu 10^{-2} M ve B ile C'nin her ikisinin konsantrasyonları 10^{-3} M ise, hücre içi koşullarda ΔG'yi hesaplayınız. Reaksiyon hücre içinde hangi yönde ilerleyecektir? (Hesap için: R = 1.98 x 10^{-3} kcal/mol/derece ve T = 298 K (25°C). ln (x) = log 10 (x).

10. Fotosentezin ışık reaksiyonları ve karanlık reaksiyonları hangileridir?

11. Her ne kadar taşıyıcı proteinler ile kanal proteinleri birçok yönden birbirlerine benzer iseler de (özgüllük ve taşınan solütün yüksek konsantrasyonlarında doygunluğa erişmesi), taşıyıcı proteinler kanal proteinlerinden daha yavaştır. Açıklayınız.

12. Transmembran proteinlerin zarı geçen bölümleri sıklıkla niçin α-sarmal yapıdadır?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Genel Kaynaklar

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman.

Mathews, C. K., K. E. van Holde and K. G. Ahern. 2000. Biochemistry. 3rd ed. Redwood City, CA: Benjamin Cummings.

Hücrelerin Moleküler Bileşimi

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230. [P]

Branden, C. and J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. New York: Garland

Chothia, C. and A. V. Finkelstein. 1990. The classification and origins of protein folding patterns. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 1007-1039. [R]

Holm, L. and C. Sander. 1996. Mapping the protein universe. *Science* 273: 595-602. [R]

Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6): 96-111. [R]

Levitt, M., M. Gerstein, E. Huang, S. Subbiah and J. Tsai. 1997. Protein folding: The endgame. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 549-579.[R]

Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205-211.[P]

Richardson, J. S. 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167-339. [R]

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57:1-28. [R]

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200:1012-1018. [R]

Enzimlerin Biyolojik Katalizörler Olarak Merkezi Rolleri

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9:155-159. [R]

Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180:149-154. [R]

Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 17-34. [R]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329. [P]

Narlikar, G. J. and D. Herschiag. 1997. Mechanistic aspects of enzymatic catalysis: Lessons from comparison of RNA and protein enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 66:19-59. [R]

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350-357. [R]

Schramm, V. L. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 693-720. [R]

Metabolik Enerji

Beinert, H., R. H. Holm and E. Munck. 1997. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-659. [R]

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sun-light. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268-271. [R]

Calvin, M. 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135: 879-889. [R]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:1-23. [R]

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154-170. [R]

Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614-621. [P]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*. 3rd ed. London: Academic Press.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493. [R]

Hücre Bileşenlerinin Biyosentezi

Hers, H. G. and L. Hue. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 617-653. [R]

Jones, M. E. 1980. Pyrimidine nudeotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49:253-279. [R]

Kornberg, A. and T. A. Baker. 1991. *DNA Replication.* 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50:133-157. [R]

Umbarger, H. E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606.[R]

Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197. [R]

Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52:537-579. [R]

Hücre Zarları

Bretscher, M. 1985. The molecules of the cell zare. *Sci. Am.* 253(4): 100-108. [R]

Dowham, W. 1997. Molecular basis tor zare phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Ann. Rev. Biochem.* 66: 199-212. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon. 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276: 39501-39504. [R]

Petty, H. R. 1993. *Molecular Biology of Zares: Structure and Function.* New York: Plenum Press.

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in zares. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell zares. *Science* 175: 720-731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembly of β-barrel zare proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399-32402. [R]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukarvotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69-99. [R]

White, S. H., A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe and K. Hristova. 2001. How zares shape protein structure. *J. Biol. Chem.* 276: 32395- 32398.[R]

Yeagle, P. L. 1993. *The Zares of CelIs.* 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

Bölüm 3

Moleküler Biyolojinin Temelleri

Kalıtım, Genler ve DNA 89

Genetik Bilginin Ekspresyonu 96

Rekombinant DNA 104

Nükleik Asitler ve Proteinlerin Saptanması 117

Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu 123

ANAHTAR DENEY: DNA Provirus Hipotezi 102

MOLEKÜLER TIP: HIV ve AIDS 105

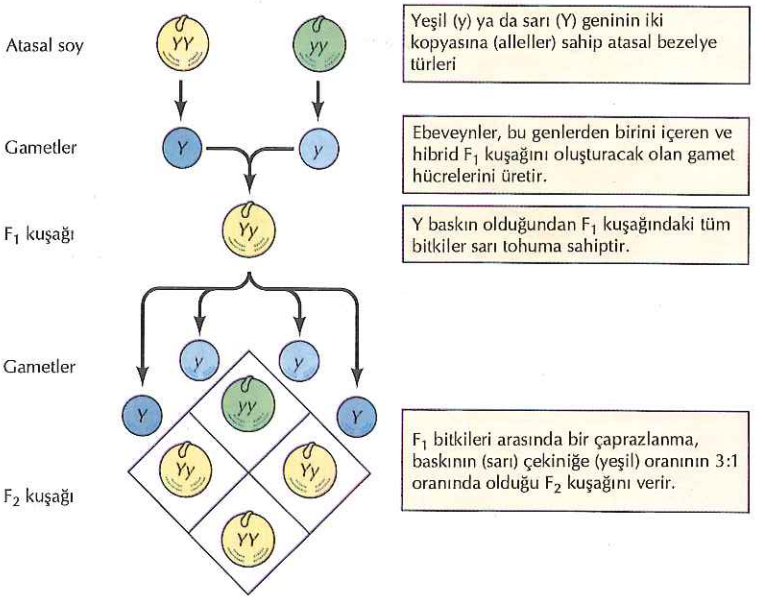
ÇAĞDAŞ MOLEKÜLER BİYOLOJİ öncelikli olarak, hücre yapı ve işlevini yöneten, genetik bilginin aktarımı ve ekspresyonundan sorumlu mekanizmaları anlamaya çalışır. Bölüm 1'de özetlendiği gibi, tüm hücrelerin ortak temel özellikleri vardır ve hücre biyolojisindeki bu bütünlük özellikle moleküler düzeyde belirgin olarak ortaya çıkar. Bu bütünlük bilim adamlarının, *E. coli* ve insan gibi birbirlerinden olabildiğince ayrı organizmaların benzer moleküler mekanizmaları kullandıkları düşüncesi ile, araştırmalarda bakteri gibi basit organizmaları model olmalarına yol açmıştır. Birçok araştırma bu varsayımın geçerliliğini kanıtlamış ve hücre moleküler biyolojisi, hücre davranışlarının farklı yönlerinin anlaşılmasında ortak bir tema sağlamıştır.

Moleküler biyolojideki ilk gelişmeler, *E. coli* ve virusları gibi, hızlı çoğalan ve kullanışlı basit bakterilerin ve virusların incelenmesi ile elde edilmiştir. Rekombinant DNA'nın saptanmasına yönelik teknoloji pek çok deneysel çalışmanın önce prokaryotlarda yapılmasını ve daha sonra ökaryot hücrelere uyarlanmasını sağlamıştır. Bu teknoloji, başlangıçta sınırlı sayıda ökaryot genlerinin saptanması ve özelliklerinin ortaya konmasına odaklanmış olmakla birlikte, bugün insanı da içine alan karmaşık yapılı bitki ve hayvanların tüm genomunun DNA dizininin belirlenmesi amacına hizmet etmektedir.

Kalıtım, Genler ve DNA

Bütün canlıların en temel özelliği, kendilerini çoğaltabilme yeteneklerinin olmasıdır. Tüm organizmalar, kendi yapı ve işlevlerini belirleyecek genetik bilgiyi ebeveynlerinden kalıtırlar. Bütün hücreler, daha önce var olan hücrelerden doğduğu için, genetik materyal kopyalanmalı ve her hücre bölünmesi sırasında yavru hücreye aktarılmalıdır. Genetik materyalin nasıl kopyalandığı ve gerek hücreden hücreye, gerekse organizmadan organizmaya nasıl aktarıldığı, biyolojinin ana sorusunu oluşturur. Bu bağlamda, genetik materyalin DNA olarak belirlenmesi ve genetik bilginin iletilme mekanizmalarının çözümlenmesi, bugün biyolojiyi moleküler düzeyde anlamamızı sağlayan temel keşiflerdir.

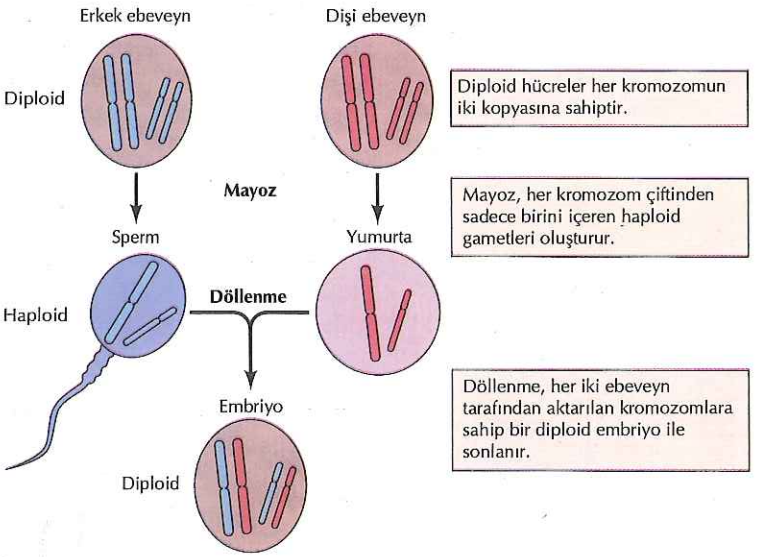
Şekil 3.1 Baskın ve çekinik genlerin kalıtımı



Genler ve Kromozomlar

Genetiğin temel kuralları Gregor Mendel'in 1865 yılında, bezelyelerle yapmış olduğu tohumlama deneylerine dayanmaktadır. Mendel, tohumların rengi gibi bir dizi iyi tanımlanmış karakterin kalıtımını incelemiş ve aktarımları konusunda genel kurallar oluşturabilmiştir. Mendel, her bir karakterin aktarımından sorumlu bir çift kalıtsal faktör (bugün **genler** olarak biliniyor) varsayarak, her olguda bir sonraki kuşakta gözlenecek kalıtım kalıbını doğru olarak belirleyebilmiştir. Her bir karakteri belirleyen gen çiftinden (**allel** denir) her biri bir ebeveynden gelir. Örneğin, biri yeşil diğeri sarı bezelyeyi oluşturacak iki farklı bezelye türünün birbirleri ile döllenmesi aşağıdaki sonuçları doğuracaktır (Şekil 3.1). Sarı (Y) ve yeşil (y) tohum karakterini belirleyen genlerden birbirine eş iki tane içeren ebeveyn türler birbirleri ile çaprazlandığında, oluşacak yavru hücre bir kopya sarı (Y) ve bir kopya da yeşil (y) tohum karakterini birlikte bulunduran bir melez olacaktır. Melez yapıdaki bu ilk kuşak bezelyeler (F_1 kuşağı) tamamen sarı olarak gözlendiğine göre, sarı olma özelliğinden sorumlu (Y) geninin, yeşil olma özelliğinden sorumlu (y) geni üzerinde **baskın** (dominant) bir etkiye sahip olduğu kabul edilir. (y) geni ise **çekinik** (resesif) olarak adlandırılır. F_1 kuşağında genetik yapı (**genotip**) Yy, fiziksel görünüm ise (**fenotip**) sarı olacaktır. Eğer F_1 kuşağındaki yavru hücreler birbirleri ile çiftleştirilecek olursa, yavru kuşakta (F_2 kuşağı) sarı bezelyeler ile yeşil bezelyelerin dağılımı, sarı tohumlu F_2 bitkileri ile yeşil tohumlular arasında 3:1 tipik oranını verir.

Mendel'in bulguları çağının çok ötesindeydi ve Mendel yasaları yeniden keşfedildiği 1900 yıllarına kadar hak ettiği önemi bulamadı. Mendel yasalarının öneminin yeniden kavranmasından kısa bir süre sonra, genlerin taşıyıcısı olarak **kromozomların** rolü öne sürüldü. Yüksek organizasyona sahip bitki hücrelerinin pek çoğunun, her bir kromozomdan birbirine eş iki kopya içerdiği, yani **diploid** yapıda oldukları görüldü. Eşey hücrelerinin (sperm ve yumurta) oluşumunda ise, her yavru hücreye eş kromozom çiftlerinden sadece birinin aktarıldığı, özel bir tip hücre bölünmesi (**mayoz**) görülür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Mayozda ve döllenmede kromozomlar
Hipotetik bir organizma üzerinde kromozom çiftinin davranışı gösterilmiştir.

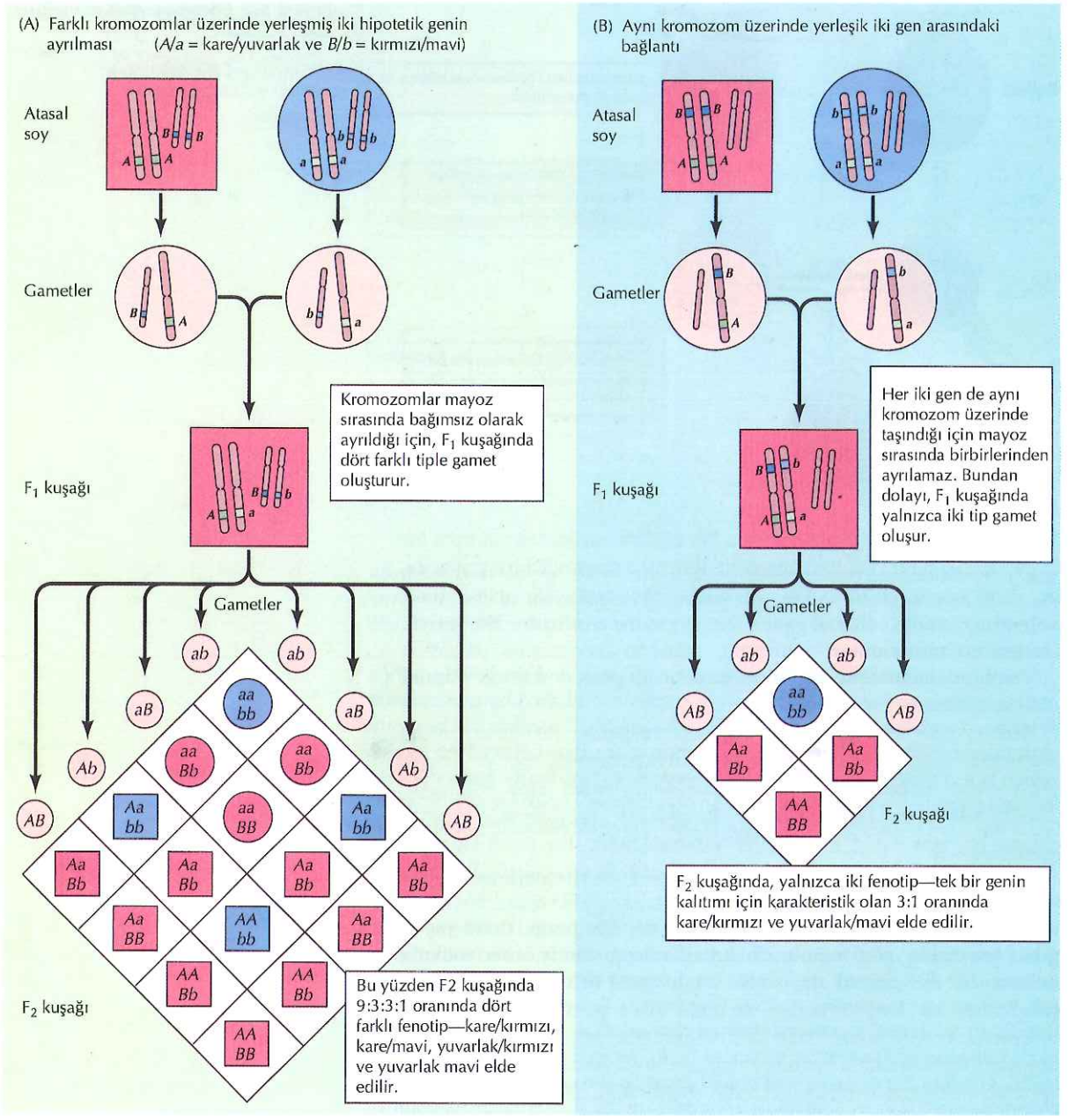
Sperm ve yumurta **haploid** dir, yani her bir kromozomdan yalnızca bir kopya içerir. Bu iki haploid hücrenin döllenme sırasında birleşmesi ile, her kromozom çiftinin dişi ve erkek ebeveynlerden gelen birer kopyasına sahip, diploid yeni bir organizma oluşur. Bu bulgu, kromozom çiftlerinin davranışının, genlerin davranışına paralellik gösterdiğini kanıtlamış ve kromozomların, genleri taşıyan yapılar olduğu sonucuna varılmıştır.

Mutasyonun temeli, genetik bağlantı ve genler ile kromozomlar arasındaki ilişkilere ait bilgilerimiz, büyük oranda, meyve sineği, *Drosophila melanogaster* ile yapılan deneylerden elde edilmiştir. *Drosophila*'ların laboratuvarda kolaylıkla üretilmesi, genetik çalışmalar için eşsiz bir imkan yaratmaktadır. Bu özellikleri ile *Drosophila*, gelişim ve farklılaşmanın genetik analizi çalışmaları için, ilk ve devamlı bir seçenek haline gelmiştir.

1900'lü yılların başlarında *Drosophila*'da, göz rengi, kanat yapısı gibi, rahatlıkla gözlenebilecek karakterlerin oluşmasına katkıda bulunan bir dizi genetik değişiklik (**mutasyon**) belirlenmişti. Üretme çalışmaları bu karakterlerden sorumlu olan genlerden bazılarının birbirlerinden bağımsız olarak kalıtıldığını gösterdi, bu da bu genlerin mayozda birbirlerinden bağımsız dağılan farklı kromozomlar üzerinde yerleşik olduğunu desteklemektedir (Şekil 3.3). Buna karşın, diğer bazı genler, sıklıkla, bir çift özellik şeklinde, birlikte kalıtılırlar. Bu tip genler aynı kromozom üzerinde birbirlerine çok yakın olarak yerleştiklerinden, birbirleri ile bağlı genler olarak adlandırılırlar. Bağlı gen gruplarının sayısı ile toplam kromozom sayısının (*Drosophila*'da dört) eşit olması, kromozomların genleri taşıdığı fikrini desteklemektedir. 1915 yılına kadar, *Drosophila*'nın dört kromozomu üzerinde yaklaşık 100 kadar gen tanımlanmış ve haritalalanmıştır, bu da kromozomların kalıtımın temel taşı olduğu yönündeki görüşün genel kabul görmesine yol açmıştır.

Genler ve Enzimler

İlk genetik çalışmalar, *Drosophila*'nın göz rengi gibi, kolaylıkla gözlenebilecek özelliklerden sorumlu genlerin tanımlanması ve kromozomal yerleşimlerinin saptanmasına odaklandı. Ancak bu genlerin ilgili fenotipleri nasıl oluşturduğu açık değildi. Genler ve



Şekil 3.3 Genlerin kuşaklar arası dağılımı ve bağlantı
(A) Farklı kromozomlar üzerinde bulunan iki hipotetik genin, şekil (A/*a*=kare/yuvarlak) ve renk (B/*b*=kırmızı/mavi) özellikleri bakımından kuşaklar arası dağılımı (B) Aynı kromozom üzerinde bulunan iki genin bağlantısı (linkaj)

enzimler arasındaki ilişkiye dikkat çeken ilk bulgular, 1909 yılında fenil alanin amino asidi metabolizmasındaki bir genetik bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal fenilketonüri hastalığının saptanması ile elde edildi (bkz. Bölüm 2'de Moleküler Tıp). Bu genetik kusurun, uygun metabolik reaksiyonu katalizlemek için gerekli enzimin eksikliğinden kaynaklandığı varsayılmış ve bu bulgu genlerin enzimlerin sentezini sağladığı genellemesine yol açmıştır.

Enzim sentezi ile genlerin ilişkisi konusunda daha kesin bulgular 1941 yılında George Beadle ve Edward Tatum'un *Neurospora crassa* mantarı kullanarak yaptıkları çalışmalarda elde edildi. Laboratuvar koşullarında *Neurospora* mantarı, Bölüm 1'de *E. coli*'nin üretilmesi konusunda sözü edilen kısıtlı ve zenginleştirilmiş kültür ortamlarına

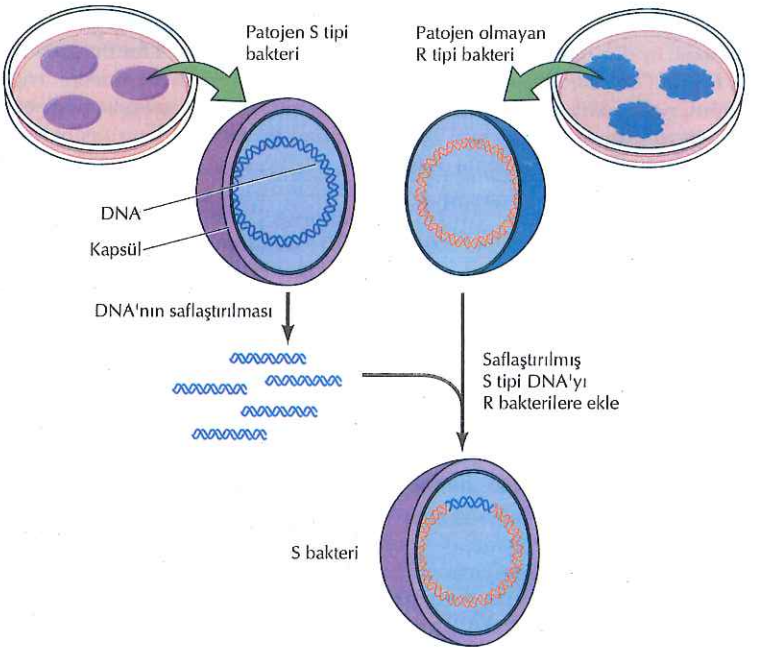
benzer koşullarda üretilebilmektedir. *Neurospora* için kısıtlı kültür ortamı sadece tuz, glukoz ve biyotinden ibarettir; zenginleştirilmiş kültür ortamına ise, amino asitler, vitaminler, pürin ve pirimidinler eklenmiştir. Beadle ve Tatum zenginleştirilmiş ortamda üreyebilen ancak, kısıtlı kültür ortamında üreyemeyen mutant *Neurospora*'lar elde ettiler. Her bir mutantın kültür ortamında üreyebilmesi için, özgül bir amino asit gibi, besinsel bir desteğe ihtiyacı olduğu saptandı. Kültür ortamına eklenmesi gereken bu besin desteği, mutantlarda o maddenin sentezindeki bir bozukluk olması ile ilişkili idi. Bu yüzden, her bir mutasyon belirli bir metabolik yolda eksiklikle sonuçlanmaktadır. Bu metabolik yolların enzimler tarafından yönetildiği bilindiği için, bu deneylerin sonucunda her genin bir enzimin yapısını belirlediği sonucuna varıldı -**bir gen-bir enzim hipotezi.** Bugün enzimlerim pek çoğunun birden fazla polipeptid içerdiği bilinmektedir, bu nedenle günümüzde bir gen-bir enzim hipotezi, her gen bir polipeptid zincirininin yapısını belirler biçiminde değiştirilerek kabul görmektedir.

DNA'nın Genetik Materyal Olarak Tanımlanması

Kalıtımın kromozomal temellerinin anlaşılması ve genler ile enzimler arasındaki ilişkilerin gösterilmesi, genin moleküler yapısını açıklamaz. Kromozomlar, DNA'nın yanı sıra proteinleri de içermektedir ve başlangıçta, genlerin aslında proteinler olduğu düşünülüyordu. DNA'nın genetik materyal olduğunun ilk kanıtı, bakteriler ile yapılan çalışmalardan elde edildi. Bölüm içinde daha sonra tartışılacağı gibi, bu deneyler genlerin fonksiyonlarını tanımlamaya yönelik yaklaşımlar için öncü niteliği taşımaktadır.

DNA'nın rolünü tanımlayan deneyler, pnömoni hastalığının etkeni olan bakteriler (*Pneumococcus*) ile yapılan çalışmalardan kaynaklandı. Virulan *Pneumococcus* suşlarının çevresi, konakçı bağışıklık sisteminin saldırılarından kendisini koruyacak polisakkarit bir kapsül ile çevrelenmiştir. Bu kapsül bakterilere kültür ortamında düzgün görüntü kazandırdığı için, kapsüllü suşlar S formu (smooth) olarak adlandırılır. Kapsül oluşturma yeteneğini kaybetmiş olan mutant bakteri suşları ise, kültür ortamında girintili çıkıntılı kenarları olan koloniler oluştururlar (rough, R) ve fareye verildiklerinde öldürücü değildirler. Kapsülsüz (R) bakteriler ile ısıtılarak-öldürülmüş kapsüllü (S) bakteriler birlikte fareye verildiğinde, farede pnömoni geliştiği ve farenin öldüğü, 1928 yılında gözlenmiştir. İlginç olarak, bu fareden izole edilen bakterilerin S tipi olduğu gözlenmiştir. Bunu izleyen deneylerde S bakterilerin bakteri hücresi içermeyen özütlerinin de, R bakterileri S tipine dönüştürme (transforme etme) yeteneklerinin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, S bakterilerden elde edilen özütteki bir madde (dönüştüren madde adı verilen), bakterilerin R den S tipine genetik dönüşümünü (**transformasyon**) uyarmaktan sorumludur.

Oswald Awery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty tarafından 1944 yılında ana dönüşüm maddesinin DNA olduğu, hem bakteri özütlerinden DNA eldesi, hem de ana dönüşüm maddesinin aktivitesinin proteinlerin enzimatik sindirimi ile değil, DNA'nın sindirimi ile ortadan kalktığının gösterilmesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.4). Bu çalışmalar, DNA'nın genetik materyal olduğunun kabulüyle sonlanmamış, konu birkaç yıl içinde bakteri virusları ile yapılan çalışmalara doğru genişletilmiştir. Bu çalışmalarda, özetle, bir bakteri virusu bir hücreyi enfekte ettiği zaman, virusun çoğalabilmesi için hücreye viral proteinin değil viral DNA'nın girmesinin gerekli olduğu



Şekil 3.4 Genetik bilginin DNA ile aktarılması
Etrafı kapsül ile çevrili ve düz hatlı koloniler (S) oluşturan patojen *Pneumococcus* suşlarından DNA izole edilir. Hastalık yapma özelliği bulunmayan, kapsülsüz bakteri (rough=R koloni) kültürüne, saflaştırılmış S DNA'sının eklenmesi, S kolonilerin oluşturması ile sonuçlanır. Saflaştırılan DNA, bakterilerin R tipinden S ye dönüşmesinden sorumlu genetik bilgiyi taşımaktadır.

gösterilmiştir. Buna ek olarak, yavru virus partiküllerine, atasal viral DNA (protein değil) aktarılmaktadır. Bu sonuçlar ile, bakteriyel transformasyonda DNA aktivitesinin rolünü açıklamaya yönelik süregelen çalışmaların uyumu, DNA'nın genetik materyal olduğu fikrinin kabul edilmesine yol açmıştır.

DNA'nın Yapısı

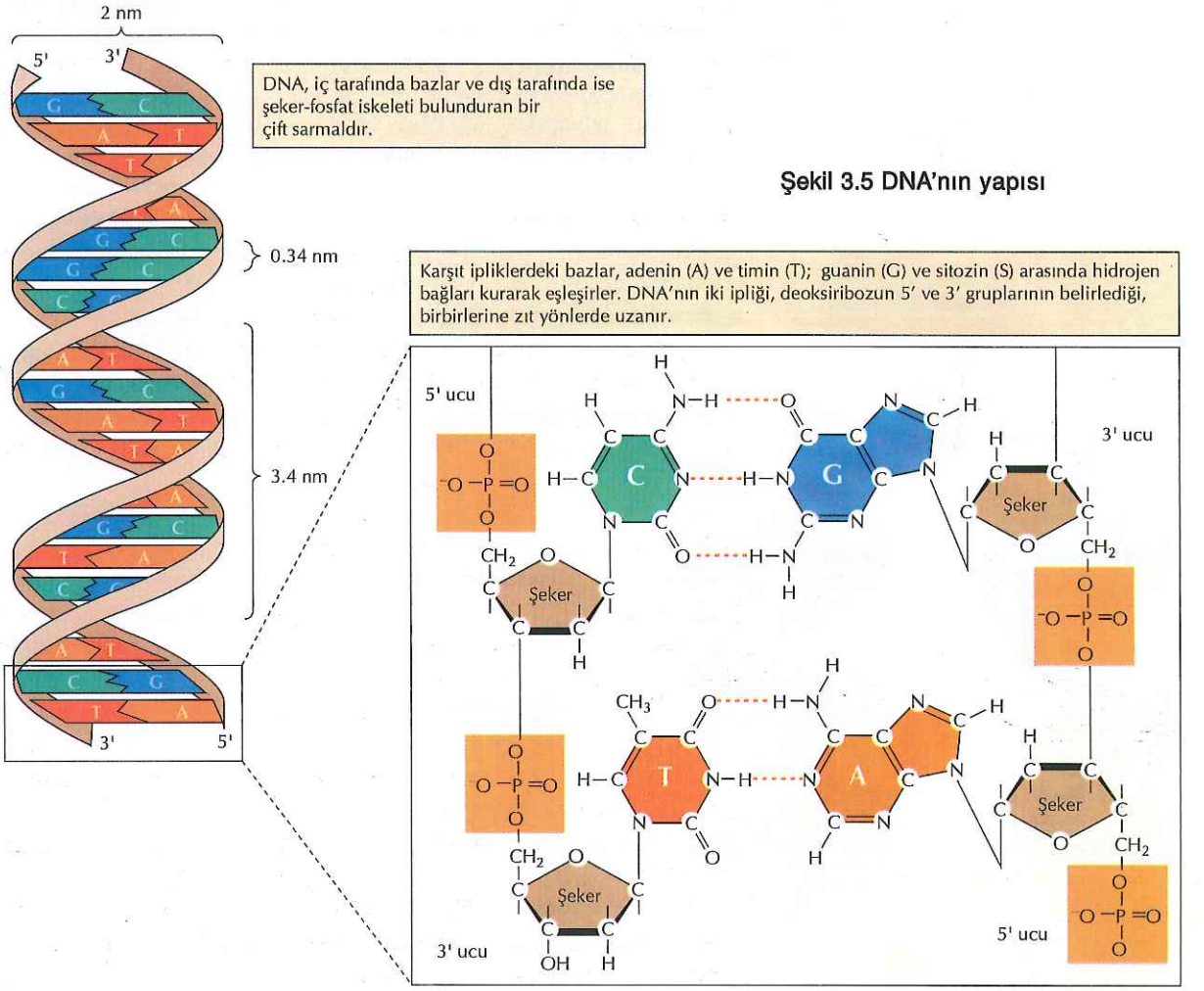
James Watson ve Francis Crick tarafından 1953 yılında belirlenen DNA'nın üç boyutlu moleküler yapısının anlaşılması, günümüzde moleküler biyolojinin temellerini oluşturmaktadır. Watson ve Crick'in çalışmaları ile, DNA'nın polimer yapısının, fosfatlanmış şeker molekülleri ile bağlantılı, iki primidin (sitozin [C] ve timin [T]) ve iki pürin (adenin[A] ve guanin [G]) olmak üzere dört nükleik asit bazından oluştuğu belirlenmişti. DNA'nın temel genetik materyal olarak rolü göze alındığında, DNA'nın üç boyutlu yapısının çözümlenmesi fonksiyonunun anlaşılabilmesi için kritik öneme sahipti. Watson ve Crick'in bu problem hakkında düşünceleri büyük oranda Linus Pauling'in hidrojen bağları ve proteinlerin ikincil yapılarında sıklıkla gözlenen α-sarmal yapısına yönelik çalışmalardan etkilenmiştir (bkz.Bölüm 2). Bu verilere ek olarak, DNA yapısının Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin'in X-ışını kristalografisi çalışmaları ile elde edilen deneysel verileri de mevcuttu. Bu verilerin analizi ile DNA molekülünün her 3.4 nm'de bir dönen bir sarmal olduğu belirlendi. Bu veriler, aynı zamanda, komşu bazlar arasındaki mesafenin 0.34 nm olduğunu da göstermekteydi. Önemli bir diğer bulgu da, sarmal çapının yaklaşık 2 nm olduğu idi ve DNA sarmalının bir değil iki DNA ipliğinden oluştuğunu desteklemekteydi.

Watson ve Crick, DNA modellerini bu verilere dayanarak oluşturdular (Şekil 3.5). Bu modelin ana noktası, DNA'nın çift sarmal yapısının, molekülün dışında şeker-fosfat omurgası ile

desteklenmesidir. DNA bazları içte yer alır, karşıt iplik üzerindeki pürin ve pirimidinler arasındaki hidrojen bağları ile bu yerleşimde tutulur. Baz eşleşmesi çok özgüldür: A daima T ile ve G ise daima C ile eşleşir. DNA bazlarının bu özgün eşleşmesi, çeşitli DNA'ların baz bileşimini analiz eden ve adenin ve timin miktarlarının ve benzer şekilde guanin ve sitozin miktarlarının birbirlerine eşit olduğunu gösteren Erwin Chargoff'un daha önceki bulguları ile tamamen uyumlu idi. Bu özgün baz eşleşmesi nedeniyle DNA'nın iki ipliği birbirinin tamamlayıcısıdır: Her iki iplik diğeri üzerindeki özgün baz dizisi için gerekli tüm bilgileri içerir.

DNA'nın Replikasyonu

DNA iplikleri arasındaki tamamlayıcı baz eşleşmesinin keşfedilmesi, her hücre bölünmesinde gerekli olan, genetik maddenin kendi replikasyonunu nasıl yönlendirdiği sorusuna moleküler bir çözüm getirdi. Bir DNA molekülünün iki ipliğinin birbirinden ayrılabileceği ve yeni tamamlayıcı ipliğin sentezi için kalıp olabileceği fikri ileri sürüldü,



Şekil 3.5 DNA'nın yapısı

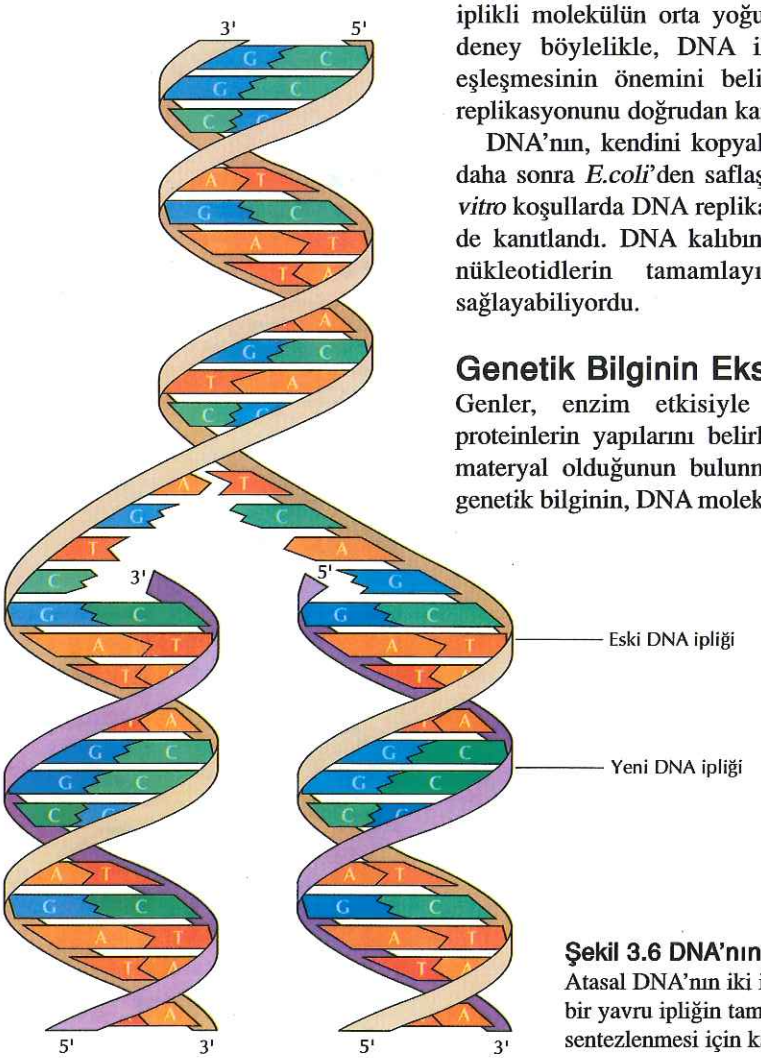
diziyi özgün baz eşleşmesi belirleyecekti (Şekil 3.6). Bu işlem, her yeni DNA molekülünde atasal DNA ipliklerinden birisi korunduğu için, **yarı korunumlu replikasyon** olarak adlandırılmaktadır.

Yarı korunumlu DNA replikasyonu 1958 yılında Matthew Meselson ve Frank Stahl tarafından yapılan ve DNA'nın, yoğunluğunu değiştiren izotoplarla işaretlenmesine dayanan, güzel bir deneyle desteklendi (Şekil 3.7). Bu deneyde, *E. coli* azotun normalde bulunan hafif izotopu (^{14}N) yerine, ağır izotopunun (^{15}N) bulunduğu bir ortamda üretildi. Bu bakterilerin ^{15}N içeren DNA'sı, ^{14}N'lü ortamda üretilen bakterilerinkine göre daha ağırdı. Bu ağır DNA, ^{14}N içeren DNA'dan CsCl yoğunluk gradienti denge santirfügasyonu ile ayırt edilebilir. Bu şekilde, ağır (^{15}N) DNA'nın hafif (^{14}N) DNA'dan ayrımlanabilme olanağı, DNA sentezinin deneysel olarak çalışılmasını olanaklı kıldı. ^{15}N ortamında üretilen DNA, ^{14}N içeren ortama aktarıldı ve bu ortamda bir kez daha replike olması sağlandı. Daha sonra DNA'ları izole edildi ve CsCl yoğunluk gradienti denge santirfügasyonu ile analiz edildi. Bu analiz sonucunda, ağır DNA molekülünden sentezlenen yeni ürünlerin (^{15}N) ve (^{14}N) DNA'sı arasındaki bir ağırlığa sahip olduğu görüldü. Bu bulgu replikasyon sırasında, ağır DNA'nın iki ipliğinin birbirinden ayrıldığı ve yeni sentezlenen hafif DNA molekülü için kalıp görevi gördüğü, sonuçta elde edilen çift iplikli molekülün orta yoğunlukta olduğu şeklinde yorumlandı. Bu deney böylelikle, DNA ikili sarmalında iplikler arasında baz eşleşmesinin önemini belirginleştiren ve yarı korunumlu DNA replikasyonunu doğrudan kanıtlayan ilk deney oldu.

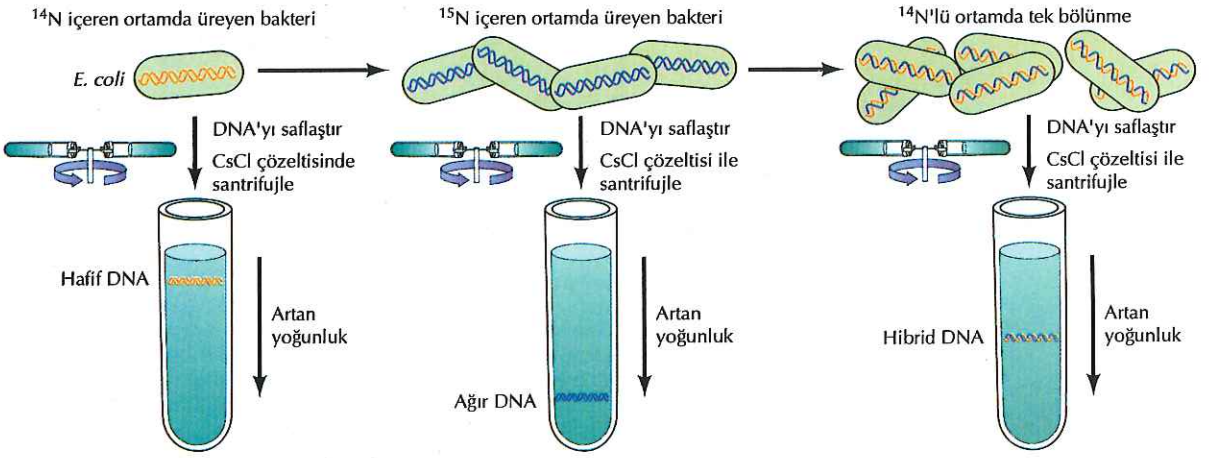
DNA'nın, kendini kopyalamak için kalıp görevi yapma yeteneği, daha sonra *E.coli*'den saflaştırılan bir enzimin (**DNA polimeraz**) *in vitro* koşullarda DNA replikasyonunu katalizlediğinin gösterilmesi ile de kanıtlandı. DNA kalıbının bulunduğu ortamda, DNA polimeraz nükleotidlerin tamamlayıcı DNA molekülüne eklenmesini sağlayabiliyordu.

Genetik Bilginin Ekspresyonu

Genler, enzim etkisiyle hücre metabolizmasını yönlendiren proteinlerin yapılarını belirleyerek işlev görürler. DNA'nın genetik materyal olduğunun bulunması ve yapısının ortaya çıkarılması ile genetik bilginin, DNA molekülünü oluşturan dört bazın (A, C, G ve T)



Şekil 3.6 DNA'nın yarı korunumlu replikasyonu
Atasal DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır ve her bir iplik yeni bir yavru ipliğin tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla sentezlenmesi için kalıp olarak görev yapar.



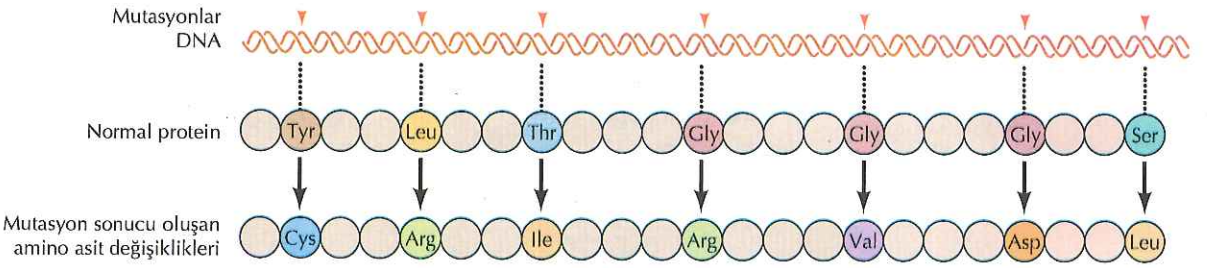
Şekil 3.7 Yarı korunumlu replikasyonun deneysel olarak gösterimi
Azotun normal izotopunu (^{14}N) içeren ortamda üretilen bakteri, ağır izotopu (^{15}N) içeren ortama aktarılır ve bu ortamda birkaç kuşak boyunca üretilir. Bakteriler daha sonra tekrar ^{14}N içeren besi yerine alınır ve bir nesil daha üretilir. Bu bakterilerden elde edilen DNA, CsCl çözeltisinde denge ultrasatrifügasyonuna tabi tutularak analiz edilir. CsCl çökeltileri bir yoğunluk gradienti yapar ve DNA molekülleri yoğunluklarının CsCl çözeltisi ile eşit olduğu pozisyonda band oluşturur. ^{15}N'ten ^{14}N'e transfer edilen bakteri DNA'ları, ^{15}N ve ^{14}N'lü DNA'ların arasındaki bir yoğunlukta bandlar verir, bu da biri hafif, diğeri ağır olmak üzere iki iplikli, melez bir molekül oluştuğunu gösterir.

belli bir düzende sıralanması ile özelleştiği açığa çıkarılmıştır. Proteinler ise, dizilimleri yapı ve fonksiyonlarını belirleyen 20 amino asidin polimerleridir. Genetik mutasyonlar ile, bir proteinin amino asit dizilimindeki bir değişiklik arasındaki ilişkiyi gösteren ilk doğrudan bağlantı, 1957 yılında, kalıtsal bir hastalık olan orak hücreli anemi hastalarının hemoglobin moleküllerinin, tek bir amino asit değişikliği ile normallerden farklı olduğunun gösterilmesi ile bulunmuştur. Ancak, DNA ve proteinler arasındaki moleküler ilişkilerin daha iyi anlaşılmasında, *E.coli* ve viruslarının genetik model olarak kullanıldığı bir dizi deney önemli olmuştur.

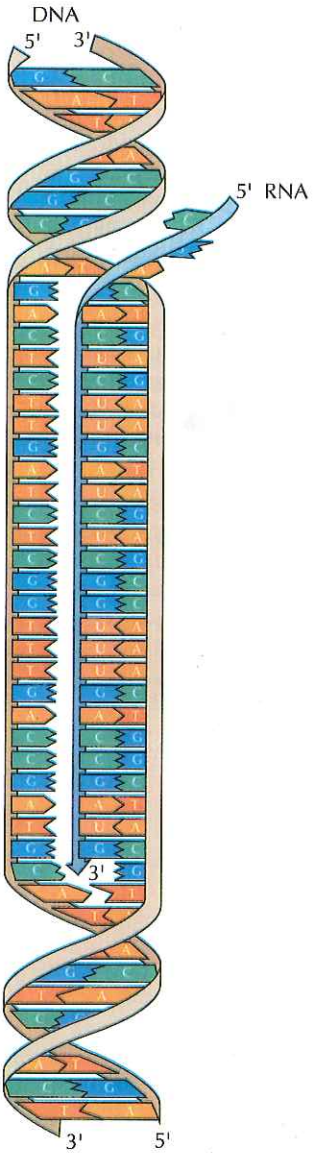
Genler ile Proteinler Arasında Doğrusal İlişki

Genler ile enzimler arasındaki ilişkiyi açıklayan en basit hipotez, DNA'daki nükleotid diziliminin bir proteindeki amino asit dizinini belirlemesidir. Bir gendeki mutasyonlar, bir nükleotidin diğerine değişmesi ya da nükleotidlerin kaybı veya eklenmesi sonucunda oluşan DNA dizilimi değişiklikleridir. Bu durumda, DNA'daki nükleotid dizilimindeki bu değişiklikler, ilgili genin kodladığı proteinin amino asit diziliminde de, buna karşılık gelen bir değişikliğe yol açabilecektir. Bu hipotez ile, bir gendeki farklı mutasyonların, kodlanan proteinin amino asit dizisini değiştirebileceği ve gendeki mutasyonun yerleşiminin, protein ürünündeki amino asit değişikliğinin yerini yansıtması gerektiği düşünülmektedir

E.coli'nin hızlı çoğalma potansiyeli ve basit genetik sistemi bu soruyu cevaplamaya yardımcı oldu. Çoğalmak için belli bir amino asit gereksinimine ihtiyaç duyan besinsel mutantları (bölümün başında tartışılan *Neurospora* mutantlarındaki gibi) da içeren değişik sayıda *E.coli* mutantları elde edilebilir. *E. coli*'nin hızlı üremesi tek bir gendeki çoklu mutantların izolasyonunu ve haritalanmasını kolaylaştırdığı için, bu çalışmalar genler ve proteinler arasındaki doğrudan ilişkinin ilk gösterimini sağladı. Bu çalışmalarda, Charles Yanofsky ve arkadaşları triptofan amino asidinin sentezi için gerekli olan enzimi kodlayan gende bir dizi mutasyon haritaladılar. Mutant genler tarafından kodlanan enzimlerle yapılan çalışmalar, bunlarda oluşan amino asit değişikliklerinin gende bu amino asitlere karşılık gelen mutasyonlarla aynı olduğunu ortaya koydu (Şekil 3.8). Böylece, proteindeki amino asit dizisinin gendeki mutasyon ile paralellik



Şekil 3.8 Genlerle proteinler arasında doğrusal ilişki
E.coli'de triptofan sentetazı kodlayan gende bir dizi mutasyon (okla gösterilmiş noktalar) gösterilmiştir. Her bir mutasyon sonucunda oluşan amino asit değişiklikleri daha sonra, mutant bakteri proteinlerinin dizi analiziyle tanımlanmıştır (normal dizi üst, mutant dizi alt sırada gösterilmiştir). Bu çalışmalar, DNA'daki mutasyonların sırasının, bu genden kodlanan proteindeki amino asit değişikliklerinin sırasıyla aynı olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.9 DNA'dan RNA sentezi
DNA'nın iki ipliği çözülür ve ipliklerden birisi tamamlayıcı RNA ipliğinin sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılır.

gösterdiği, daha önce de öngörüldüğü gibi, DNA'daki özgül nukleotidlerin proteindeki amino asit diziliminden sorumlu olduğu varsayımı doğrulanmış oldu.

Mesajcı RNA'nın Rolü

DNA'daki nükleotid dizisinin proteindeki amino asit dizisini belirlediği ispatlanmış olmakla birlikte bu, DNA'nın doğrudan protein sentezini yönettiği anlamına gelmez. Zaten, DNA hücrede çekirdek içinde yerleşik olmasına karşılık protein sentezi sitoplazmada gerçekleştiği için, buna olanak yoktur. Bu nedenle genetik bilgiyi DNA'dan protein sentezinin gerçekleştiği bölgelere (ribozomlara). ulaştıracak bir aracı gereklidir.

DNA'ya olan yapısal benzerliği nedeni ile, bir DNA kalıbından sentezlendiği düşünülen RNA molekülü, bu aracı molekül için en yakın aday gibi görünüyordu (Şekil 3.9). RNA molekülü DNA molekülünden, çift-iplikli değil tek-iplikli oluşu, şeker içeriğinin deoksiriboz yerine riboz olması ve primidin bazı olan Timin (T) yerine Urasil (U) içermesi ile ayrılmaktadır (bkz. Şekil 2.10). Bununla birlikte, ne şeker yapısındaki değişiklik ne de Timin yerine Urasil geçmiş olması, beklenen baz eşleşmelerini etkilemez, dolayısıyla RNA sentezi doğrudan bir DNA kalıbı tarafından yönlendirilebilir. Buna ek olarak, RNA molekülü çoğunlukla sitoplazma içinde yerleşik olduğu için, DNA'dan ribozomlara bilgi taşıyan aracı olması akla yatkındı. RNA'nın bu özellikleri, moleküler biyolojide **ana dogma** olarak bilinen genetik bilgi akışı için yolak önerilmesini sağladı:

DNA → RNA → Protein

Bu kavrama göre, RNA molekülleri kalıp DNA'dan sentezlenmektedir (bu süreç **transkripsiyon** olarak adlandırılır) ve proteinler de RNA kalıbından sentezlenmektedir (bu süreç **proteine çevirim** olarak adlandırılır).

Ana dogmaya göre varsayılan RNA aracılarının deneysel kanıtı, Sydney Brenner, Francois Jacob ve Matthew Meselson tarafından T4 bakteriyofajı ile enfekte edilmiş *E.coli* çalışmalarından elde edildi. *E.coli* RNA'sının sentezinin, T4 fajı ile enfeksiyon oluştuktan sonra durduğu ve enfekte bakteride yeni sentezlenen RNA'nın sadece T4 DNA'sını kalıp aldığı gözlendi. Yeni oluşan bu T4 RNA, bakteri ribozomları ile bağlanmakta, böylece bilgi, DNA'dan protein sentezinin olduğu bölgeye iletilmekteydi. Genetik bilginin aktarılmasında aracı molekül olan ve protein sentezi için kalıp rolü

oynayan bu RNA molekülü, **mesajcı RNA (mRNA)** olarak adlandırılmıştır. Kalıp DNA'dan RNA'nın sentezlenmesi işlemi bir enzim (RNA polimeraz) tarafından katalizlenmektedir.

mRNA'ya ek olarak, diğer iki RNA tipi, protein sentezinde önemli rol oynar. **Ribozomal RNA (rRNA)** ribozomların bir elemanı olarak, **taşıyıcı RNA (tRNA)** ise mRNA kalıbındaki bilgiye uygun amino asitlerin sıralanması için uyarlayıcı olarak iş görür. Bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarına aşağıda değinilmekle birlikte, daha ayrıntılı bilgi Bölüm 6 ve 7'de yer almaktadır.

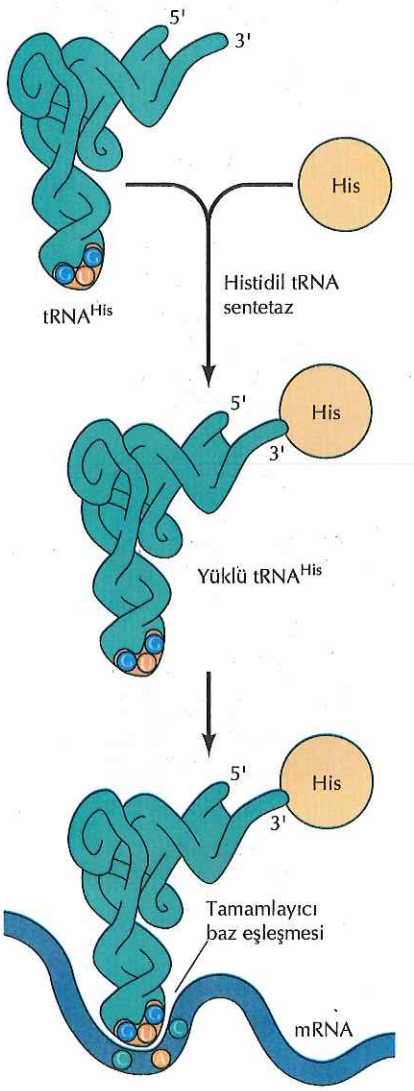
Genetik Kod

mRNA'daki nükleotid dizisi proteindeki amino asit dizisine nasıl çevrilir? Gen dışa vurumunun bu aşamasında, kimyasal olarak birbirleri ile ilgisiz iki makromolekül -nükleik asitler ve proteinler- arasındaki genetik bilgi aktarımı, genlerin davranışını anlamada iki yeni tip problem ortaya çıkartmıştır.

İlk olarak, amino asitler nükleik asitler ile yapısal olarak ilişkisiz oldukları için, amino asitlerin protein yapısına katılmaları sırasında mRNA ve amino asitler arasında doğrudan tamamlayıcı bir eşleşme olması imkansız görünmektedir. O halde protein sentezi sırasında mRNA kalıbına uygun amino asitler nasıl sıralanabilmektedirler? Bu soru, proteine çevrim sırasında tRNA molekülünün mRNA ve amino asit arasında bir adaptör rolü oynadığının keşfedilmesi ile cevaplanabil-miştir (Şekil 3.10). Protein sentezinde kullanılmadan önce, her bir amino asit özgün bir enzim aracılığı ile kendine uygun bir tRNA molekülüne tutunmuş durumdadır. Her tRNA'nın üzerindeki bir tanıma bölgesi ile mRNA üzerindeki bunu tamamlayıcı dizi arasında baz eşleşmeleri olur, böylece bağlı amino asit mRNA kalıbı üzerindeki doğru pozisyonuna yönlendirilir.

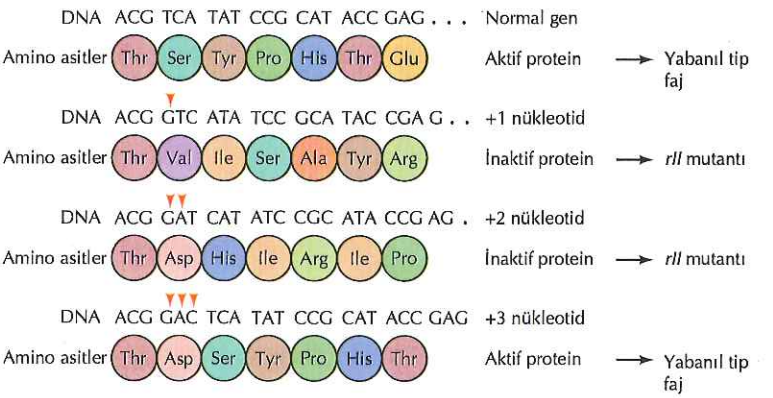
İkinci problem ise, nükleotid dizisinin amino asit dizisine çevriminde **genetik kod**'un nasıl belirlendiğidir. Dört farklı nükleotidin diziliminin içerdiği bilgi, proteinlerdeki 20 farklı amino asidin dizilimine nasıl dönüşebilmektedir? Yirmi amino asit sadece dört farklı nükleotid tarafından belirlendiğine göre, her bir amino asidin kodlanması için en az üç nükleotid kullanılmalıdır. Tek bir nükleotidin tek bir amino asit kodladığını varsayarsak dört nükleotid sadece dört amino asit, iki nükleotidin bir amino asidi kodladığı varsayıldığında ise, dört nükleotid toplam onaltı (4^2) amino asit kodlayabilir. Üçlü olarak kullanıldığında, dört nükleotid 64 (4^3) farklı amino asit kodlayabilir ve bu sayı proteinlerde bulunan 20 farklı amino asidi kodlamak için rahatlıkla yeterlidir.

Üçlü kod için direkt deneysel kanıtlar, etraflıca çalışılmış olan ve *rII* olarak adlandırılan gende mutasyon içeren T4 bakteriyofajlarıyla çalışılarak elde edildi. Bu gende mutasyonu olan fajlar, kültür ortamında normal fajlardan kolaylıkla ayırt edilebilen oldukça iri plaklar oluştururlar. Bu yüzden *rII* mutantlarının eldesi ve haritalanması kolaydır ve bu lokusun ayrıntılı genetik haritasının oluşturulması mümkün olmuştur. *rII* mutantları arasında bir ya da iki nükleotidin eklenmesi veya çıkarılması ile oluşturulan rekombinant-lardan yapılan çalışmalar, bu mutasyonların her zaman mutant fenotip oluşması ile sonuçlandığını gösterdi. Üç nükleotid eklenmesi ya da



Şekil 3.10 Taşıyıcı RNA'nın fonksiyonu

Taşıyıcı RNA protein sentezi sırasında bir adaptör olarak iş görür. Her bir amino asit (örn., histidin) kendisine özgün bir tRNA'nın 3' ucuna uygun bir enzim (bir aminoaçil tRNA sentetaz) aracılığı ile bağlanır. Yüklü tRNA'lar daha sonra tamamlayıcı baz eşleşmesiyle bir mRNA kalıbı üzerinde sırayla dizilirler.

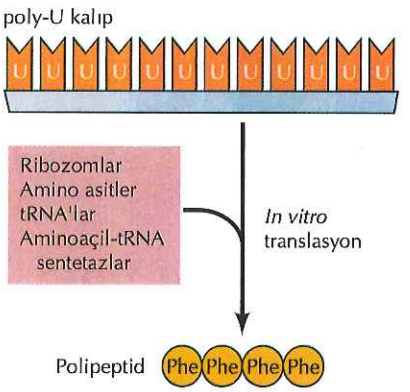


Şekil 3.11 Üçlü kodun genetik kanıtları
T4 bakteriofajının *rII* geninde, bir, iki ya da üç nükleotid ilavesi şeklinde bir dizi mutasyon çalışılmıştır. Bir ya da iki nükleotid ilavesi mutasyon sonrasındaki dizinin okuma çerçevesini değiştirir. Bu yüzden, mutasyondan sonraki amino asitlerin tamamı anormaldir ve mutant faj oluşumuna neden olan inaktif bir protein üretilir. Buna karşın üç nükleotid eklenmesi, sadece tek bir amino asidi değiştirir. Genin geri kalan kısmında okunma sırası normaldir ve yabanıl tip fajın oluşmasını sağlayan aktif bir protein üretilir.

kaybı olan fajlar ise, genellikle, normal işlevlerine devam etmekteydi (Şekil 3.11). Bu bulgular, genlerin, belirli bir noktadan başlayarak üçlü nükleotid grupları halinde okunduğunu gösterdi. Bu durumda, bir ya da iki nükleotidin eklenmesi ya da çıkarılması genin okuma çerçevesini değiştirecek ve sentezlenen proteinde hatalı amino asilerin kodlanmasına yol açacaktır. Bunun aksine, üç nükleotidin birarada kaybı ya da fazlalığı ise, tek bir amino asidin eklenmesi ya da eksikliği ile sonlanacak ve bu bölgeden sonraki amino asit dizini değişmeden kalarak, işlevsel bir protein elde edilecektir.

Genetik şifrenin çözülmeye başlaması, hangi nükleik asit üçlülerinin hangi amino asitlere karşılık geldiğine yönelik bir soruyu gündeme getirdi. Bu problemin çözümü için, protein sentezinin hücre dışında gerçekleştirildiği *in vitro* sistemler kullanıdı (***in vitro* translasyon**). Ribozomlar, amino asitler, tRNA'lar ve bu tRNA'lara uygun amino asitlerin bağlanmasını sağlayan enzimler (aminoaçil-tRNA sentetazlar) içeren hücre özütlerinde, amino asitlerin proteinleri oluşturacak şekilde diziliminin katalizlendiği biliniyordu. Ancak, böyle bir sistemde protein sentezi için, ribozoma bağlanmış mRNA'ların olması gerekliydi ve ortama mRNA eklenmesi, protein sentezini yönlendirdiğinden, baz dizileri bilinen sentetik mRNA'lar kullanılarak genetik kodun ortaya çıkarılması mümkün olabilirdi.

Bu konudaki ilk deney Marshall Nirenberg ve Heinrich Matthaei tarafından, sadece urasil içeren sentetik RNA polimerlerinin *in vitro* translasyonu ile gerçekleştirildi (Şekil 3.12). Bu poli-U-kalıbın sadece tek bir amino asiti-fenilalanin- içeren bir polipeptid zinciri oluşumu ile sonlandığı görüldü. Böylelikle üçlü UUU tekrarının fenilalanini kodladığı anlaşılmış oldu. Yalnızca tek nükleotidin kullanıldığı benzer deneylerle, AAA'nın lizin ve CCC'nin de prolini tanımladığı ortaya kondu. Şifrenin kalan kısmının çözülmesi farklı nükleotid karışımlarını içeren RNA polimerleri kullanarak gerçekleştirildi, sonuçta amino asitleri oluşturan 64 olası üçlünün (**kodon**) tamamının şifresi belirlendi. Bu 64 kodondan, 61 tanesi belli bir amino asite özgünken, kalan üçü (UAA, UAG ve UGA) protein sentezi sonlanma sinyalini oluşturan dur kodonlarıydı. Kod gevşektir, yani birden fazla kodon aynı amino asidi kodlar. Birkaç örnek dışında (Bölüm 10'da tartışılacak) doğadaki tüm canlılar aynı genetik şifreyi kullanırlar ve bu durum doğadaki tüm canlıların aynı ortak atadan evrimleştiği fikrine güçlü bir destek sağlamıştır.



Şekil 3.12 Üçlü UUU kodonu fenilalanini kodlar
Tekrarlayan urasil dizilerini (bir poli-U kalıbı) içeren sentetik bir RNA'nın in vitro translasyonu, sadece fenilalanin içeren bir polipeptid senteziyle sonuçlanır.

RNA Virusları ve Ters Transkripsiyon

Genetik kodun açıklanması, hücre moleküler biyolojisinin temel kurallarının belirlenmesi anlamına geliyordu. Ana dogmaya göre,

TABLO 3.1 Genetik Kod

Birinci Pozisyon	İkinci pozisyon U	C	A	G	Üçüncü pozisyon
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Dur	Dur	A
	Leu	Ser	Dur	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

genetik madde DNA'dır ve kendini eşleyebilme ve daha sonra, protein sentezi sırasında kalıp görevi görecek olan mRNA kalıbını oluşturma yeteneğindedir. Bununla birlikte, Bölüm 1'de de söz edildiği gibi, pek çok virus genetik materyal olarak DNA yerine RNA içerir, bu durum da genetik bilgi aktarımının farklı tipleri olduğunu düşündürmektedir.

RNA genomu ilk kez, pek çoğu sadece RNA ve proteinden oluşan bitki viruslarında saptandı. Bu viruslarda RNA'nın genetik madde olduğunun doğrudan kanıtları ise, 1950'lerde tütün mozaik virusundan elde edilen RNA'nın konakçı hücreyi enfekte edebildiğinin ve enfeksiyon yapabilen yeni viruslar oluşturabildiğinin gösterilmesi ile elde edildi. Viral RNA genomlarının replikasyon tipleri ise *E.coli*'nin RNA bakteriyofajları ile yapılan çalışmalarla belirendi. Bu virusların DNA'dan RNA'ya çevirim ya da, DNA'nın kendisini eşlemesinde kullanılan aynı, baz eşlemesi mekanizması ile, RNA kalıbından RNA sentezlenmesini (RNA-ile yönlendirilen RNA sentezi) katalizleyen spesifik bir enzim kodladıkları bulundu.

Poliovirus ve influenza virusları gibi pek çok hayvan virusunun RNA'dan RNA sentezi yoluyla replike oldukları bulunmuş olsa da, enfekte ettikleri hayvanlarda kanser oluşturma yetenekleri nedeniyle özel ilgi gören bir hayvan virus ailesinin (RNA tümör virusları), kendilerini eşleme aşamasında kullandıkları mekanizma bu değildi. Her ne kadar, bu virusların viral partikülleri genomik RNA içeriyor ise de, 1960'larda Howard Temin tarafından yapılan deneyler, bu virusların replikasyonu için enfekte ettikleri hücrede DNA sentezinin gerekli olduğunu göstermiş ve RNA tümör viruslarının (**retrovirus** olarak adlandırılan) replikasyon aşamasında DNA provirus olarak adlandırılan aracı bir DNA molekülüne ihtiyaç duyduğu hipotezinin oluşmasına öncülük etmiştir (Şekil 3.13). Bu hipotez, başlangıçta-RNA ile yönlendirilen DNA sentezini öngördüğü ve dolayısı ile ana dogmaya aykırı olduğu için, başlangıçta bilim çevrelerince kabul görmemiştir. Fakat 1970'lerde Temin ve David Baltimore, birbirlerinden bağımsız olarak, RNA tümör viruslarında kalıp RNA'dan DNA sentezini katalizleyen yeni bir enzim keşfettiler. Buna

ANAHTAR DENEY

DNA Provirus Hipotezi

Nature of the Provirus of Rous Sarcoma
Howard M. Temin
McArdle Laboratory, University of Wisconsin, Madison, WI
National Cancer Instutute Monographs, Volume 17, 1964, pages 557-570

Howard Temin

Bağlam
Kansere yol açan virusların ilki olarak tanımlanan Rous sarkom (RSV) virusu, kanser moleküler biyolojisi çalışmalarında deneysel sistem olarak özellikle tercih edilen bir virustur. Howard Temin bu alanda çalışmaya 1958 yılında, lisans üstü öğrenci iken, kültür ortamındaki normal hücrelerin RSV ile enfeksiyon sonrasında kanser hücresine transformasyonunu gösteren ilk ölçüm yöntemlerini geliştirerek başladı. Bu tip kantitatif *in vitro* bir yöntemin varlığı, daha sonraki hücre transformasyonu ve virus replikasyonu çalışmaları için gerekli olan aracı oluşturdu. Temin, çalışmaya devam ettikçe, RSV replikasyonunun diğer RNA viruslarından belirgin olarak farklı olduğunu gözlemledi. Bu deneyler Temin'in, enfekte hücrelerde viral RNA'nın enfekte hücrenin DNA'sına kopyalandığını belirten DNA provirus hipotezini öne sürmesine neden oldu – hipotez evrensel olarak kabul gören ana dogma hiptezinin karşıtıydı.

Deneyler
DNA hipotezi pek çok farklı tipte deneysel kanıta dayanmaktaydı. Bunlardan ilki, RSV mutantları kullanılarak yapılan hücre transformasyon çalışmalarının, transforme hücrelerin önemli özelliklerinin virusun genetik bilgisi ile belirlendiğini göstermesiydi. Bu bilgi, virus replikasyonu olmasa bile, hücre bölünmesini takiben düzenli olarak yavru hücrelere aktarılmaktaydı. Bu nedenle Temin, enfekte hücrelerde provirus denilen ve değişmeden kalıtılabilen bir viral genomun var olduğunu öne sürdü.

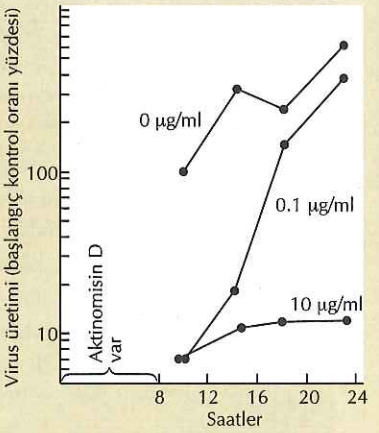
Metabolik inhibitörlerle yapılan deneyler, provirusun DNA olduğunu kanıtladı. İlkin, kalıp DNA'dan RNA sentezini engelleyen aktinomisin D'nin, RSV ile enfekte hücrelerde virus üretimini engellediği bulundu (bkz.şekil). İkinci olarak, DNA sentezi inhibitörlerinin RSV ile hücre enfeksiyonunun erken safhalarını durdurduğu görüldü. Böylelikle DNA sentezinin enfeksiyonun başlangıç aşamalarında gerekli olduğu ve yeni virusların daha sonraki üretimleri için DNA -ile yönlendirilen RNA sentezine gereksinim duydukları ortaya çıktı, bu da provirusun viral RNA genomunun kopyası olan bir DNA olduğu fikrinin öne sürülmesine neden oldu. Temin, nükleik asit belirleme yöntemleri kullanarak, enfekte hücrelerin DNA'larında viral DNA'nın varlığını göstererek hipotezi için daha ileri kanıtlar elde etmeyi denedi, ancak o dönemde var olan yöntemlerin duyarlılığının düşük olması nedeniyle elde ettiği veriler güvenilir olmadı.

Etki
Bu nedenle, DNA provirus hipotezi, temel olarak genetik deneyler temelinde ve metabolik inhibitörlerin etkisi olarak sunuldu. Moleküler biyolojideki kabul gören ana dogma hipotezinin karşıtı olduğu için çok iddialı bir öneriydi. Temin'in RNA'dan DNA'ya bilgi aktarımı yolu ek olarak, enfekte hücrelerde viral DNA dizilerinin varlığını açıkça gösteren kanıtlar elde edildi. Böylece günümüzde, **ters transkripsiyon** olarak bilinen RNA'dan DNA'nın sentezi, biyolojik sistemlerde bilginin aktarılması için kullanılan yollardan biri olarak kabul edildi.

Ters transkripsiyon sadece retrovirusların çoğalmasında önemli olmayıp, aynı zamanda moleküler ve hücre biyolojisine iki önemli açılım getirdi. Bunlardan ilki, ters transkripsiyonun yalnızca retroviruslar ile sınırlı olmayıp, Bölüm 4 ve 5'de tartışıldığı gibi, sıklıkla, DNA dizilerinin bir kromozom bölgesinden diğerine yer değiştirmesinden de sorumlu olmasıdır. Gerçekten de, insan genomunun dizilenmesi çalışmaları, insan genomik DNA'sının yaklaşık %40'ının ters transkripsiyon mekanizması ile oluştuğunu

ile RSV replikasyonu hipotezi bu haliyle bilimsel çevrelerce sadece reddedilmekle kalmadı, aynı zamanda alay konusu oldu. Bununla birlikte, Temin 1960'lara kadar konu üzerinde ısrar etti ve hipotezine daha ikna edici, daha fazla kanıt bulmak için deneylerine devam etti. Bu çabalar, 1970 yılında Temin ve Satoshi Mizutani ve eş zamanlı olarak David Baltimore tarafından, ana dogmanın aksine bir hipotezin var olabileceğinin kesin biyokimyasal kanıtı olarak, RNA kalıbından DNA sentezleyen ve günümüzde revers transkriptaz olarak bilinen bir viral enzimin keşfi ile sonlandı.

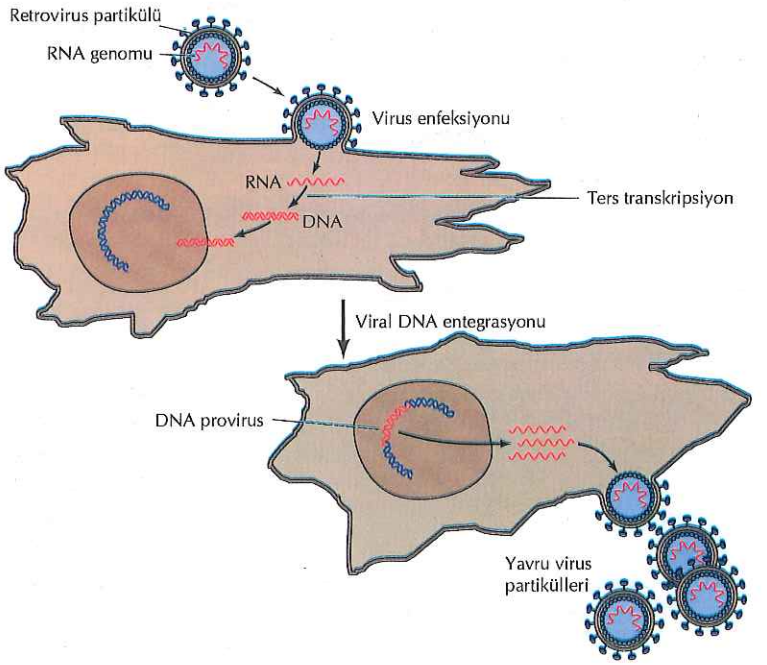
Temin 1970'de yazmış olduğu yayınında bu sonuçları şu cümlelerle açıklamaktaydı : "kanıtlar DNA provirus hipotezinin doğru olduğuna,



Aktinomisin D'nin RSV çoğalması üzerine etkisi. RSV ile enfekte edilmiş olan hücreler Aktinomisin D ile, belirtilen konsantrasyonlarda 8 saat süre ile kültüre edilir. Daha sonra Aktinomisin D ortamdan uzaklaştılır ve üretilen virus miktarı ölçülür.

RNA tümör viruslarının, hücrede iken DNA genomuna ve virion halinde iken ise RNA genomuna sahip olduğunun güçlü kanıtı oluşmuştur. Bu sonucun, viral karsinogenez teorileri ve büyük bir olasılıkla diğer biyolojik sistemlerde bilginin aktarımı konularında güçlü etkileri olacaktır". Temin'in öngördüğü gibi, RNA –ile yönlendirilen DNA sentezinin keşfi, kanserin, insan retroviruslarının ve gen yeniden düzenlenmelerinin anlaşılmasında belirgin ilerlemelere yol açtı. Daha sonraları, revers transkriptaz enzimi cDNA klonlaması ve dolaylı olarak hücre ve moleküler biyolojinin pek çok alanında önemli ilerlemeler sağlamıştır.

göstermiştir. İkinci önemli nokta da, RNA-ile yönlendirilen DNA sentezini katalizleyen enzimlerin (**revers transkriptaz**'lar) deneysel amaçlarla, herhangi bir RNA molekülünün DNA kopyalarını oluşturmakta kullanılabilmesidir. Revers transkriptaz enziminin kullanımı böylece, ökaryot hücrelerinden elde edilen mRNA'ların, bir sonraki bölümde tartışılacak olan güncel DNA uygulamalarındaki moleküler yaklaşımlar kullanılarak çalışılmasına olanak tanımıştır.



Şekil 3.13 Ters transkripsiyon ve retrovirus replikasyonu
Retroviruslar viral partiküllerinde RNA genomları içerir. Bir retrovirus konakçı bir hücreyi enfekte ettiği zaman, ters transkripsiyon mekanizmasını kullanarak viral RNA'nın bir DNA kopyasını sentezler. Bu viral DNA daha sonra konakçının kromozomal DNA'sına bir DNA provirus olarak katılır ve transkripsiyonla yavru virus RNA'larını oluşturur.

Rekombinant DNA

Moleküler biyolojideki klasik deneyler, genlerin doğası ve ekspresyonu konularında temel kavramlar geliştirmemizde büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmalar temel olarak genetik analizlere dayandığı için, başarıları büyük oranda, hızlı çoğalan, basit yapıdaki organizmaları (bakteri ve viruslar gibi) model olarak kullanmalarına bağlı idi. Buna rağmen pek çok ökaryot genomu (örn., insan genomu) *E.coli* gibi bir organizmadan binlerce kez daha karmaşık yapıda olduğu için, belirlenen temel prensiplerin ökaryot hücrenin karmaşık yapısını anlamada ne kadar başarılı olacağı şüpheli idi. Bu tip karmaşık genomlarla moleküler düzeyde çalışma fikri 1970'lerin başlarında cesaret kırıcıydı. Özellikle genlerin izole edilmesi ve çalışılması imkansız gibi görünmekteydi.

Moleküler biyolojinin ilerlemesi önündeki bu sorun, herhangi bir hücre tipine ait genin izole edilmesine, dizisinin belirlenmesine ve genlerle çalışılabilmesine olanak veren, rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi ile aşıldı. Rekombinant DNA uygulamaları, ökaryotik genler ve genomların yapı ve fonksiyonları üzerinde ayrıntılı moleküler çalışmalar yapılmasını ve böylelikle hücre biyolojisini anlamamızda devrim niteliğinde gelişmeler yaşanmasını olanaklı kıldı.

Restriksiyon Endonükleazlar

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinde ilk aşama, DNA'yı belli dizinlerden kesen enzimlerin **-restriksiyon endonukleazların-** tanımlanması oldu. Bunların, bakterilerde, yabancı bir DNA molekülünün (örn., viral DNA) hücreye girişine karşı bir savunma mekanizması sağlayan enzimler olduğu saptandı. Bakterilerin, DNA molekülünü yüzden fazla farklı tanıma bölgesinden kesen, çok sayıda restriksiyon endonükleazı vardır ve her biri, DNA üzerinde dört ila sekiz bazlık (örnekler Tablo 3.2'de) özgün dizileri tanır.

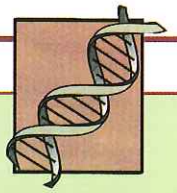
Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı özgün dizinlerden kestiği için, DNA molekülünü belli bölgelerden kesmek için kullanılabilir. Örneğin, *EcoRI* endonükleazı altı baz çiftinden oluşan GAATTC dizisini tanımaktadır. Bu dizi bakteriyofaj λ DNA'sında beş farklı

TABLO 3.2 Kesim enzimlerinin bazılarına ait tanıma bölgeleri

Enzim[a]	Kaynak	Tanıma Bölgesi[b]
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens H*	*GGATCC*
EcoRI	*Escherichia coli RY13*	*GAATTC*
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	*GGCC*
*Hind*III	*Haemophilus influenzae Rd*	*AAGCTT*
*Hpa*I	*Haemophilus parainfluenzae*	*GTTAAC*
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	*CCGG*
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	*GATC*
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	*GCGGCCGC*
*Sfi*I	*Streptomyces fimbriatus*	*GGCCNNNNNGGCC*
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	*TCGA*

[a] Enzimler izole edildikleri türlere göre isimlendirilir aynı türden izole edilen birden fazla enzim numara ile belirtilir (örn., *HpaI* ve *HpaII* gibi).

[b] Tanıma bölgesi sadece çift iplikli DNA'nın tek ipliğindeki diziyi gösterir. 'N' aynı bölgede yer alacak herhangi bir bazı temsil etmektedir.



MOLEKÜLER TIP

HIV ve AIDS

Hastalık

Kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) ilk kez 1981'de tanımlanmış yeni bir hastalıktır. Bugün, 50 milyondan fazla insanın HIV virusundan etkilendiği ve 20 milyon insanın da bu hastalıktan öldüğü, dünyaya yayılmış salgın bir hastalık haline gelmiştir. AIDS'in klinik bulguları, bağışıklık sisteminin normal işleyememesinden kaynaklanır. Normal çalışan bir bağışıklık sistemi olmayınca AIDS'li hastalar, sağlıklı bir insanın rahatlıkla direnç gösterebildiği virus, bakteri mantar, protozoa gibi etmenlerin enfeksiyonuna duyarlı hale gelmektedirler. AIDS'den etkilenenlerde özellikle lenfomalar ve Kaposi sarkomu gibi bazı tip kanserler sıklıkla görülürse de, ölüm genellikle yukarıda sayılan fırsatçı enfesiyonların sonucudur.

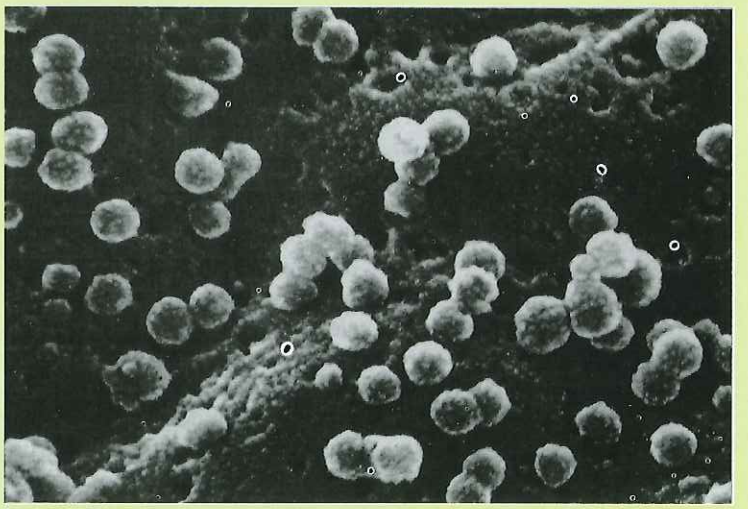
Moleküler ve Hücresel Temel

AIDS hastalığına, 1983 yılında Robert Gallo ve Luc Montagnier'in araştırma grupları tarafından keşfedilen bir retrovirus (insan immün yetmezlik virusu veya HIV) neden olur. HIV, temel olarak normal bağışıklık cevabı için gerekli olan özel bir tip lenfositi (T4 lenfositler) enfekte eder. Raus sarkom virusu gibi pek çok retrovirusun aksine HIV, enfekte ettiği hücreyi kanserleştirmez. Bunun yerine, HIV replike olduğu hücrenin ölümüne yol açar, sonuçta T4 lenfosit topluluğunun azalmasına yol açarak, enfekte kişilerde bağışıklık sisteminin yetmezliğe girmesine neden olur. Bağışıklık sisteminin tükenmesi AIDS hastalığının klinik bulguları olan fırsatçı enfeksiyonların ve kanserlerin oluşmasına yol açar.

Korunma ve Tedavi

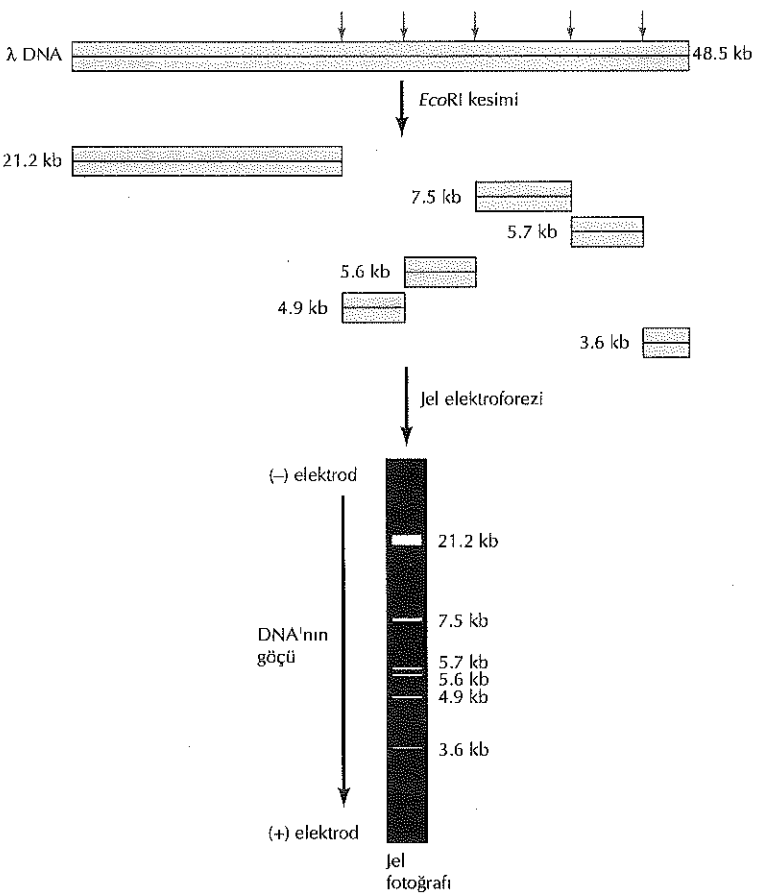
Günümüzde AIDS'ten korunmanın tek yolu HIV enfeksiyonundan kaçınmaktır. HIV vücut dışına çıktığı zaman kolaylıkla inaktif hale gelen, zayıf bir virustur ve bu nedenle, bireylerin enfekte bir birey ile alışılmış doğrudan temas yolları ile bu virusu alma olasılığı yoktur. HIV başlıca üç yolla bulaşır: cinsel temas yoluyla, HIV bulaşmış kan ürünleri yoluyla ve gebelik ve süt verme sırasında anneden çocuğa aktarılarak. HIV'in belirlenmesinden sonra, transfüzyon sırasında kullanılan kan ve kan pıhtılaşma ürünlerinin güvenliğini kontrol etmek olanaklı hale gelmiştir. Virusun diğer yollardan bulaşması ise, basitçe, kişinin güvenli seks yapması ve damar yolu ile ilaç enjeksiyonu için ortak iğneleri kullanmaktan kaçınması gibi, bireysel riski en aza indirecek güvenlik önlemleri alması ile önlenebilir.

HIV virüsünün tanımlanmış olması bireyin enfeksiyona yakalanma riskini azaltmaya yönelik davranışlarının ötesinde, bu hastalıktan korunma ve tedavi için bazı olasılıkların ortaya çıkmasını da sağladı. HIV biyolojisinin bazı özelliklerinden kaynaklanan zorluklara rağmen, HIV enfeksiyonunu önleyen aşı üzerinde ısrarla çalışılmaktadır. Buna alternatif olarak, enfeksiyonu almış olan bireylerde virusun kendisini çoğaltmasını önleyen ilaçlar, etkin bir tedavi oluşturmaktadır. Bu ilaçlar, ya HIV revers transkriptazını ya da viral proteinlerin işlev görmesini sağlayan HIV proteazı üzerinde baskılayıcı rol oynayarak etki yaparlar. Bu ilaçların birlikte kullanımları bugün AIDS hastalarının yaşam sürelerini uzatmış olmakla birlikte, özellikle gelişmekte olan ülkeler için daha etkin, daha ucuz ve daha pratik ilaçların geliştirilmesine gereksinim vardır.



T lenfositinden HIV virusunun tomurcuklanmasını gösteren taramalı elektron mikroskop görünümü (Cecil Fox/Photo Researchers, Inc). 0.1 μm

bölgede bulunur, böylelikle *EcoRI* λ DNA'sını büyüklükleri 3.6 ila 21.2 kilobaz (1 kilobaz veya kb = 1000 baz çifti) arasında altı parçaya ayırır (Şekil 3.14). Bu parçalar, moleküllerin elektrik akımı altında göç etme hızlarına göre ayrılmalarını temel alan genel bir yöntem olan **jel elektroforezi** tekniği kullanılarak, büyüklüklerine göre ayrımlanabilirler. Genellikle agaroz ya da poliakrilamidden oluşmuş

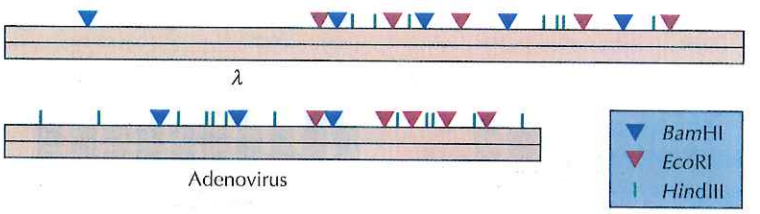


Şekil 3.14. λ DNA'sının EcoRI enzimi ile kesimi ve jel elektroforezi.
EcoRI, λ DNA'sını beş bölgeden (oklar) keserek DNA 'nın toplam altı parçaya ayrılmasına neden olur. Bu parçalar agaroz jel elektroforezinde yürütülerek birbirlerinden ayrılır. DNA parçaları pozitif elektroda doğru göç ederler, küçük parçalar jel boyunca diğerlerine oranla daha hızlı hareket eder. Elektroforez işleminden sonra, DNA bir floresan boya ile boyanıp fotoğraflanır. DNA parçalarının büyüklüğü jel fotoğrafı üzerinde gösterilmiştir.

bir jel, içinde elektrod bulunan iki tampon bölmesi arasına yerleştirilir. Örnek (örn., analiz edilecek olan DNA parçacıkları), jel içinde oluşturulmuş olan kuyucuklara pipet aracılığı ile doldurulur ve jele elektrik akımı verilir. Nükleik asitler (fosfat omurgalarından dolayı) negatif yüklüdür ve pozitif elektroda doğru göç eder. Jel, tıpkı bir elek gibi, daha büyük moleküllerin göçünü geciktirici bir işlev görür. Daha küçük moleküller daha hızlı hareket ederek, nükleik asit karışımından oluşan DNA parçacıkları büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılır.

Büyüklük farkının yanısıra, kesime uğramış parçacıkların sırası, örneğin λ DNA *Eco*RI kesim bölgelerinin haritası, farklı yollarla da belirlenir. Çok sayıda farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak, viral genom gibi DNA'ların detaylı **kesim bölgesi haritaları** çıkarılabilir (Şekil 3.15). Buna ek olarak, restriksiyon enzimleri ile kesilme sonrası elde edilen her bir DNA parçası jel elektroforezi sonrasında jelden kesilerek çıkarılabilir ve DNA'larının dizilenmesi gibi daha ileri çalışmalarda kullanılabilir. Pek çok virus DNA'sı bu yaklaşım kullanılarak tanımlanmıştır.

Bununla birlikte restriksiyon endonükleaz kesimi, tek başına, hücresel genom gibi büyük DNA moleküllerinin analizi için yeterli ayırım gücü sağlamaz. Altı baz çiftlik tanıma bölgesi olan bir kesim enzimi (*Eco*RI gibi) istatistiksel olarak DNA'yı her 4096 baz çiftinde bir ($1/4^6$) keser. Bu hesaba göre 48.5 kb büyüklüğünde olan bir λ DNA'sının, Şekil 3.14'de şematize edilen sonuçlarla uyumlu olarak, toplam on adet EcoRI parçacığı oluşturması beklenir. Ancak daha büyük genomların bu tip enzimlerle kesimleri oldukça farklı sonuçlar



Şekil 3.15. λ ve adenovirus DNA'larının kesim bölgesi haritaları
E.coli bakteriyofajı λ (48.5 kb) ve insan adenovirus-2 (35.9 kb) DNA'larının *Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III enzimleri için kesim bölgeleri

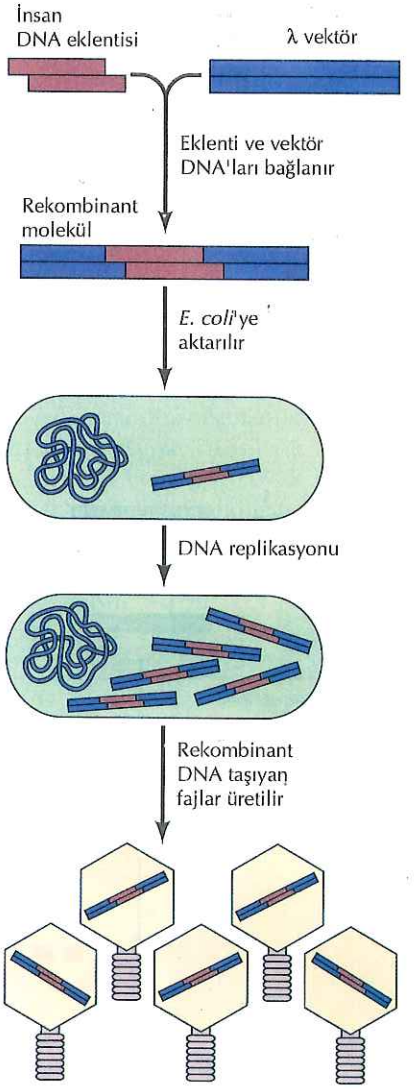
vermektedir. Örneğin, insan genomu yaklaşık olarak 3 $X10^6$ kb uzunluğunda olduğu için 500,000 den fazla *EcoRI* fragmanı oluşması beklenir. Bu kadar büyük sayıda DNA parçası ayrımlanamaz, böylece insan genomunun *EcoRI* kesiminden sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsünde birbirinden ayrı bantlar yerine, devamlı bir sürüntü görüntüsü ortaya çıkar. Böyle bir kesimden tek bir fragmanı izole etmek imkansız olduğu için, restriksiyon endonükleaz kesimi, tek başına, daha ileri analizlerde kullanılmak üzere homojen DNA fragmanları elde etmek için uygun değildir. Bu amaçla saflaştırılmış DNA parçalarının eldesi moleküler klonlama yoluyla sağlanabilir.

Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması

Moleküler klonlama tekniğinin esası klonlanmak istenilen DNA parçacığının (örn., bir insan DNA parçası) konakçı hücrede bağımsız olarak çoğalabilme kapasitesine sahip bir DNA molekülüne (**vektör** denir) eklenmesi işlemidir. Vektör DNA dizisine bağlı DNA eklentisi ile oluşan moleküle **rekombinant molekül** ya da **moleküler klon** adı verilir. Rekombinant molekülün replikasyonuna izin verecek uygun bir konakçı bulunduğu takdirde, DNA eklentisinin yüksek miktarda elde edilmesi sağlanabilir. Örneğin, insan DNA parçacıkları bakteriyofaj λ vektörlerine klonlanabilir (Şekil 3.16). Bu rekombinant moleküller *E.coli* içine aktarılabilir ve burada etkin bir şekilde replike olarak, insan DNA eklentisini içeren milyonlarca yavru faj oluşur. Bu faj DNA'larının izole edilmesi ile, insan DNA'sının tek bir parçasını içeren rekombinant moleküller yüksek miktarlarda elde edilebilir. Böylelikle, istenilen DNA parçacığı insan genomik DNA'sı üzerinde 100,000'de birlik kısmı oluştururken, λ vektörüne klonlandıktan sonra aynı parçacık molekülün 10'da birlik bir kısmını kapsar. Ayrıca, parça, geri kalan vektör DNA'sından restriksiyon endonükleaz kesimi ve elektroforezle kolayca ayrılabilir, analiz ve daha sonraki diğer çalışmalar için uygun saflıkta insan DNA parçası elde edilmiş olur.

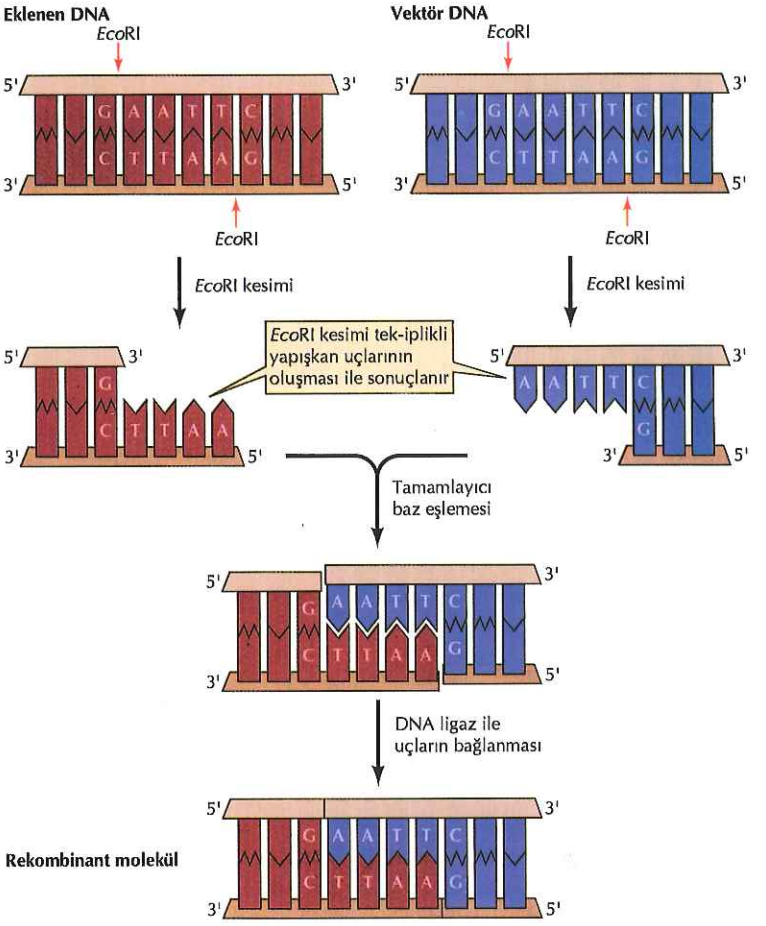
Rekombinant molekülleri oluşturmak için kullanılan DNA parçacıkları, genellikle restriksiyon endonükleaz kesimi yolu ile elde edilir. Bu enzimlerin pek çoğu, enzim tanıma bölgelerinde kendilerine karşılık gelen bazlarla eşleşmeye açık, tek iplikli yapışkan uçlar bırakacak şekilde kesim yapar (Şekil 3.17). Birbirinin eşleniği olan uçların arasındaki bağlantı, DNA ipliklerindeki kırıkları yapıştıran bir enzim olan **DNA ligaz** ile, kalıcı olarak kurulur (bkz. Bölüm 5). Böylelikle iki farklı DNA parçası (örn., insan DNA parçası ve λ vektör DNA'sı) aynı kesim enzimi ile kesilerek hazırlandığında, rekombinant DNA molekülünü oluşturacak bağlantıyı yapmaya da hazır hale gelmiştir.

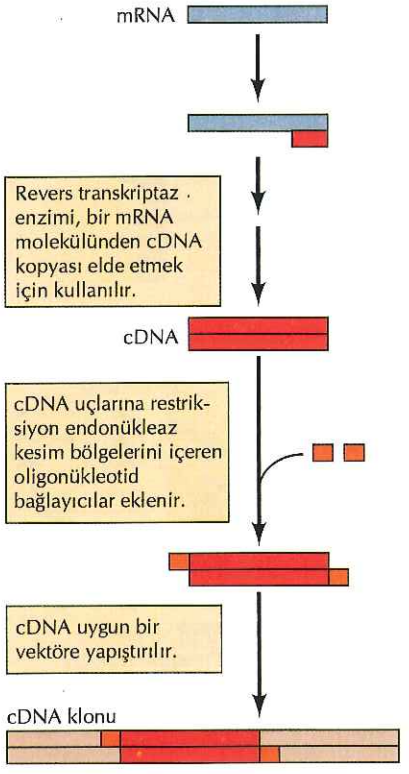
Klonlamada kullanılabilen DNA bölgeleri, sadece restriksiyon enzimi kesim bölgeleri ile sonlananlarla sınırlı değildir. Farklı restriksiyon endonükleaz enzim kesim bölgeleri içeren sentetik DNA



Şekil 3.16 Bir rekombinant DNA molekülünün oluşturulması
İnsan DNA'sının bir parçası λ DNA vektörü içine yerleştirilir. Oluşturulan bu rekombinant molekül daha sonra, kendisi çoğalırken, insan DNA parçasını içeren rekombinant fajları da üretecek olan *E.coli* içine aktarılır.

Şekil 3.17 DNA moleküllerinin bağlanması
Vektör ve eklenecek olan DNA'lar, tek iplikli yapışkan uçlar oluşturacak şekilde, bir restriksiyon enzimi ile (*Eco*RI gibi) kesilir. Vektör ve eklenecek olan DNA parçası daha sonra tamamlayıcı baz eşleşmesiyle birleşir. DNA ipliklerinin DNA ligaz enzimiyle kovalent bağlanması ile bir rekombinant molekül oluşturulur.





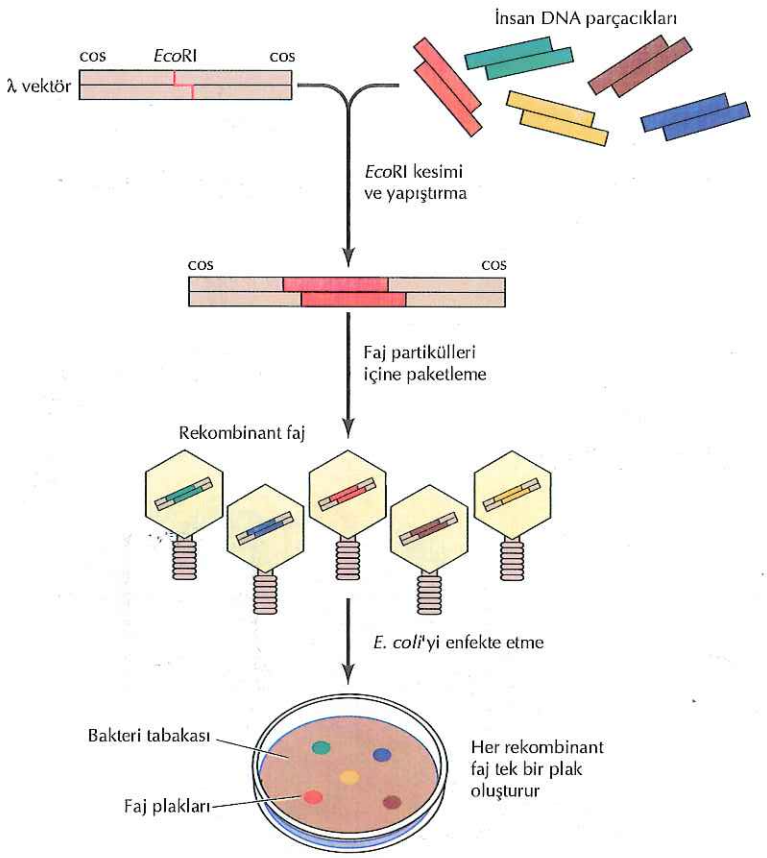
Şekil 3.18 cDNA klonlaması

bağlayıcıları "linkers", herhangi bir DNA parçasının küt ucuna eklenebilir. Bağlayıcılar kimyasal sentez yoluyla kolayca elde edilebilen kısa oligonükleotidlerdir ve herhangi bir DNA parçasının bir vektöre bağlanmasını sağlamak için hazırlanmışlardır.

Yalnızca DNA değil, RNA dizileri de klonlanabilir (Şekil 3.18). Bu işlemde ilk aşama revers transkriptaz enzimini kullanarak RNA'dan DNA sentezlenmesidir. Oluşan DNA ürünü (Kalıp RNA'nın tamamlayıcı olduğu için **cDNA** olarak adlandırılır) daha sonra, anlatıldığı şekilde vektör DNA'sına bağlanır. Ökaryot genlerinde mRNA'dan kesip-eklenme mekanizması ile çıkarılan ve böylelikle koda dönüşmeyen diziler (intronlar; bkz. Bölüm 4) bulunduğu için, cDNA'ların genomik DNA'yla birlikte klonlanması, gen yapı ve fonksiyonlarını anlayabilmede çok önemlidir.

Rekombinant DNA Vektörleri

Rekombinant moleküllerin oluşturulabilmesi için, klonlanacak DNA eklentisinin büyüklüğüne ve deneyin amacına bağlı olarak birçok farklı tipte klonlama vektörleri kullanılabilir. DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılmasına yönelik temel vektör sistemleri bu kısımda anlatılmıştır. Klonlanmış DNA'nın ekspresyonu ve rekombinant

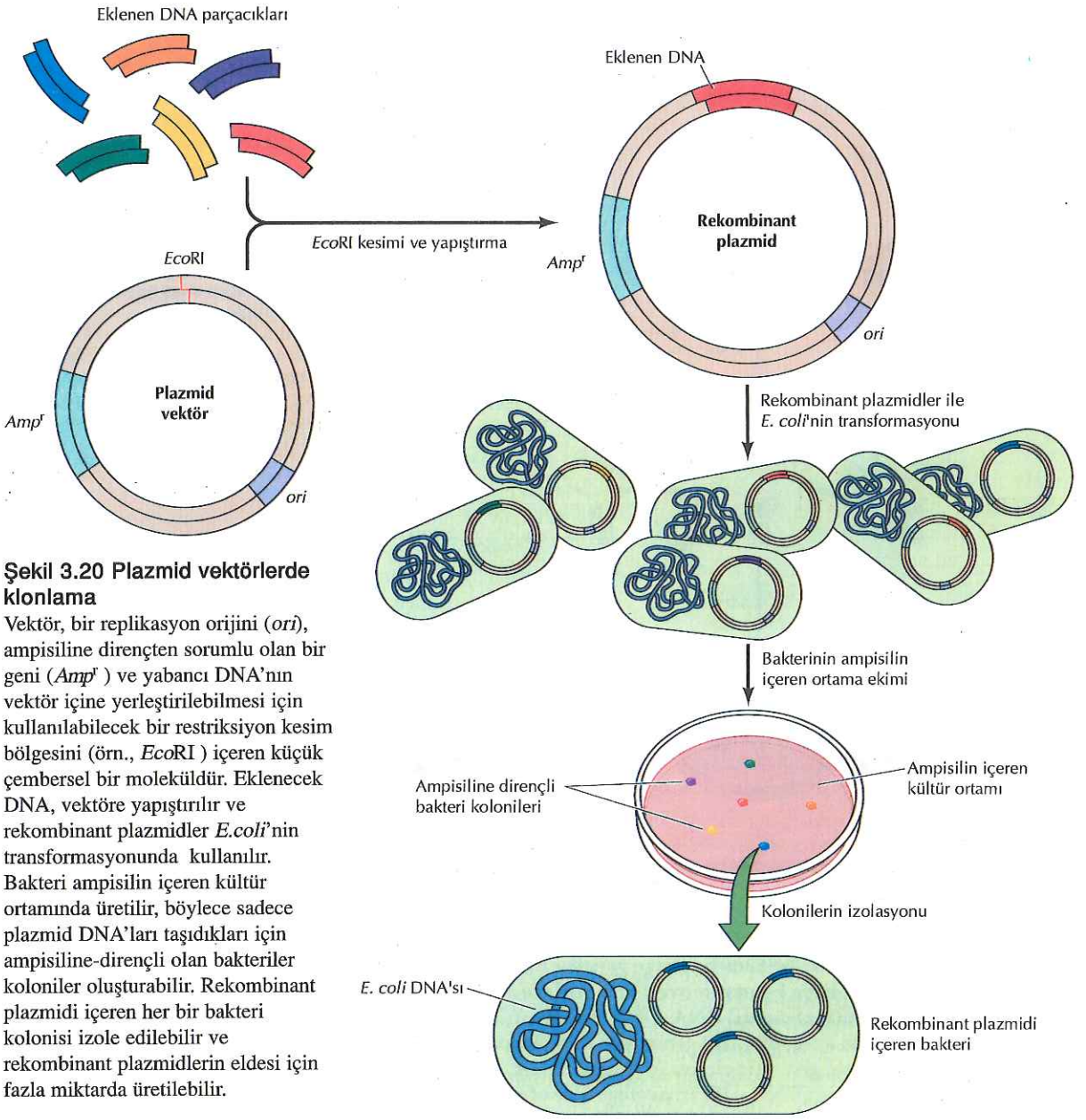


Şekil 3.19 Bakteriyofaj λ vektörlerine klonlama
Vektör, klonlanmış DNA'nın yerleşmesi için bir kesim bölgesi (örn., bir *Eco*RI bölgesi) içerir. Buna ek olarak, vektör DNA'sının her iki ucunda, DNA'nın faj partikülleri içine paketlenmesi için gereken cos bölgeleri (yapışkan uçlar) bulunur. Eklenecek DNA (örn., insan DNA'sı) vektöre yapıştırılır ve rekombinant moleküller faj proteinleriyle karıştırılarak, faj partiküllerinin içine paketlenir. Rekombinant fajlar daha sonra *E.coli*'yi enfekte etmede kullanılır. Enfekte bakteri kültüründe klonlanmış tek bir DNA parçasını taşıyan her bir rekombinant faj, bir faj plağı oluşturur. Özgün DNA parçacığını taşıyan faj öncülü kendi plağından izole edilerek, çok miktarda üretilebilir.

molekülün ökaryot hücresine aktarımı için geliştirilen diğer vektörler daha sonraki kısımlarda anlatılacaktır.

Bakteriyofaj λ vektörleri, ökaryot hücrelerinden hem genomik, hem de cDNA klonlarının izolasyonu için sıklıkla kullanılan vektörlerdir (Şekil 3.19). Lamda klonlama vektörlerinde virus çoğalması için gerekli olmayan bölgeler çıkarılarak, yerine, klonlanacak DNA'nın bağlanmasını sağlayacak özgün kesim enzim bölgeleri eklenir. Klonlanacak DNA parçacığı 15 kb büyüklüğünde olduğunda bile, rekombinant genom, paketlenerek faj partikülleri içerisine yerleştirilebilmektedir. İnsan DNA'sının genomik klonlarını elde etmek için, örneğin, ortalama 15 kb büyüklüğündeki, rastgele kesilmiş insan DNA parçacıkları λ vektör kollarına bağlanır. Oluşturulan bu rekombinant DNA molekülleri, *in vitro* koşullarda, DNA ile λ proteinlerinin (paketleme özütleri olarak adlandırılır) karıştırılması ile, faj partikülleri içine etkin olarak paketlenir. Bu paketlenmiş partiküller daha sonra *E.coli* hücre kültürlerini enfekte etmekte kullanılır. Her bir rekombinant faj, kültürlerde tek bir plak oluşturduğu için, insan DNA'sının özgün parçalarını taşıyan rekombinantlar elde edilebilir. Buna ek olarak, çalışılacak özel genleri içeren fajlar, sonraki bölümde anlatılacağı şekilde nükleik asit hibridizasyonu ya da diğer tarama yöntemleri ile saptanabilir.

Plazmid vektörler (Şekil 3.20), klonlanan DNA dizilerinin faj vektörlerindekinden daha kolay çalışılmasına olanak tanır. Plazmidler, bakterilerde kromozomal DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen,



Şekil 3.20 Plazmid vektörlerde klonlama
Vektör, bir replikasyon orijini (*ori*), ampisiline dirençten sorumlu olan bir geni (*Amp*^{r}) ve yabancı DNA'nın vektör içine yerleştirilebilmesi için kullanılabilecek bir restriksiyon kesim bölgesini (örn., *Eco*RI) içeren küçük çembersel bir moleküldür. Eklenecek DNA, vektöre yapıştırılır ve rekombinant plazmidler *E.coli*'nin transformasyonunda kullanılır. Bakteri ampisilin içeren kültür ortamında üretilir, böylece sadece plazmid DNA'ları taşıdıkları için ampisiline-dirençli olan bakteriler koloniler oluşturabilir. Rekombinant plazmidi içeren her bir bakteri kolonisi izole edilebilir ve rekombinant plazmidlerin eldesi için fazla miktarda üretilebilir.

küçük, çembersel DNA molekülleridir. Plazmid DNA'sında bulunması tek gerekli olan, konakçı hücre DNA polimerazına DNA molekülünü kopyalama sinyali oluşturan bir DNA dizisi- **replikasyon orijini**dir. Buna ek olarak, plazmid vektörleri antibiyotiklere direnci sağlayan genleri (örn., ampisilin direnci) bulundurdukları için, plazmid taşıyan bakteriler kolaylıkla seçilebilir. Plazmid vektörler 30 ila 45 kb büyüklüğündeki λ faj vektörlerinin aksine, yalnızca 2 ila 4 kb büyüklüğünde DNA'dan oluştuğu için, vektöre bağlanan DNA parçacığının analizini kolaylaştırmaktadır.

Bir plazmid vektöre klonlama için, eklenecek DNA parçası vektördeki uygun kesim bölgesine bağlanır ve rekombinant molekül *E.coli*'nin transforme edilmesinde kullanılır. Plazmid DNA içeren,

antibiyotiğe dirençli koloniler seçilir. Plazmid içeren bu bakteriler büyük miktarlarda üretilerek, DNA'ları izole edilir. Her bir hücrede yüzlercesi bulunan küçük, çembersel plazmid DNA'lar bakteri kromozomal DNA'sından ayrılabilir ve sonuçta klonlanmış DNA eklentisinin analizleri için uygun plazmid DNA'sı saflaştırılmış olur.

Genomik DNA analizi ile yapılan pek çok çalışmada, λ vektörlerinin alabileceğinden çok daha büyük DNA parçacıklarının klonlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan beş ana tip vektör vardır (Tablo 3.3). **Kozmid** vektörler yaklaşık 45 kb büyüklüğünde parçacıkları taşıyabilirler. Bu vektörler, klonlanan DNA'nın, faj partikülleri içine daha etkin olarak paketlenmesini sağlayacak olan bakteriyofaj λ dizileri bulundururlar. Buna ek olarak, kozmidler, replikasyon orjini ve plazmidlerde bulunan antibiyotik direnç genlerini de bulundurdukları için, bakteri hücresi içinde plazmid olarak çoğalabilirler. Lamda bakteriyofajı yerine, P1 bakteriyofajından geliştirilmiş olan iki adet vektör daha tanımlanmıştır. 70-100 kb DNA parçalarını taşıma kapasitesinde olan P1 bakteriyofaj vektörleri, rekombinant molekülün *in vitro* koşullarda P1 faj partikülü içine paketlenmesine ve daha sonra *E.coli* içinde plazmid olarak replikasyonuna olanak tanıyan dizileri bulundurur. **P1 yapay kromozomu (PAC)** vektörleride P1 bakteriyofaj dizinleri bulundurlar, ancak, *E.coli* içine doğrudan plazmid olarak girebilmesi olanaklıdır ve 130-150 kb büyüklüğe kadar DNA parçacıklarını taşıyabilirler. **Bakteri yapay kromozomu (BAC)** vektörleri, *E.coli*'nin doğal plazmidinden (F faktör olarak adlandırılır) köken almıştır. Replikasyon orijini ve diğer F faktör dizileri 120-300 kb'ye kadar parçalar taşıyan BAC'ların kararlı şekilde replikasyonuna olanak tanır. Daha büyük parçalar (250-400 kb), **maya yapay kromozom (YAC) vektörleri** kullanılarak klonlanabilir. Bu vektörler, maya replikasyon orijini ve maya hücresi içindeki kromozomlarda olduğu gibi doğrusal şekilde çoğalmaya olanak sağlayan diğer dizileri (Bölüm 4'de tartışılacak olan sentromer, telomer gibi) bulundururlar.

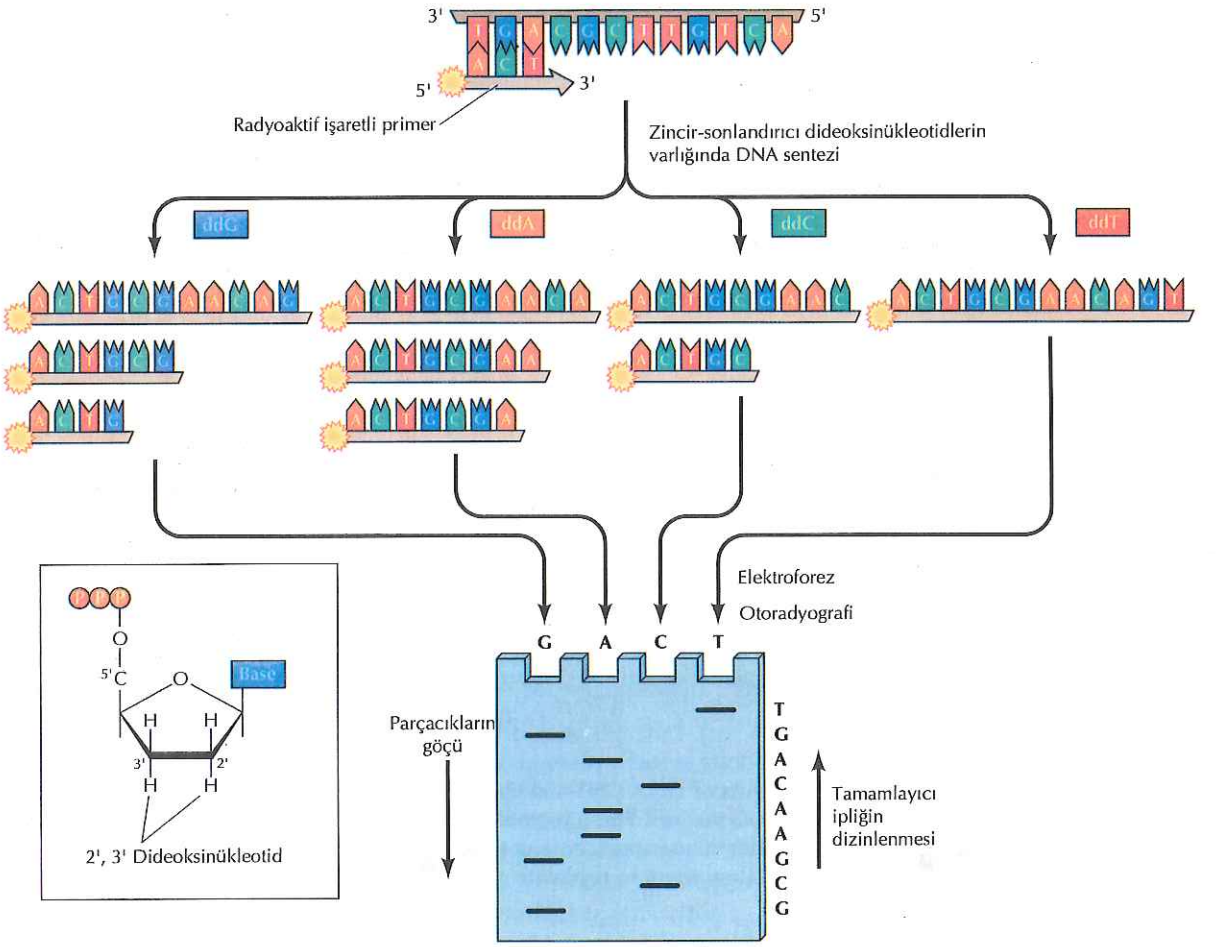
DNA Dizi Analizi

Moleküler klonlama, her bir DNA parçasının, nükleotid dizilerinin belirlenmesini de içeren, ayrıntılı incelemelerine olanak sağlayacak miktarlarda eldesini olanaklı kılmıştır. Gerçekten de pek çok genin nükleotid dizininin çıkarılması, sadece bu genlerin kodladıkları proteinlerin yapısının anlaşılmasını değil, aynı zamanda gen ekspresyonlarını düzenleyen dizilerin özelliklerinin de anlaşılmasını sağlamıştır. Bunun da ötesinde, yeni bulunan genlerin kodlayan dizileri genellikle, daha önce çalışılmış olan genlerle ilişkilidir ve böylelikle yeni izole edilen genlerin fonksiyonları, bu tip dizilim benzerlikleri kullanılarak, doğru olarak tahmin edilebilmektedir.

Günümüzde kullanılan DNA dizi analizi yöntemleri hızlı ve doğru bir biçimde, birkaç kilobaz büyüklükte DNA dizinlerinin belirlenmesine

TABLO 3.3 Büyük DNA Parçalarının Klonlandığı Vektörler

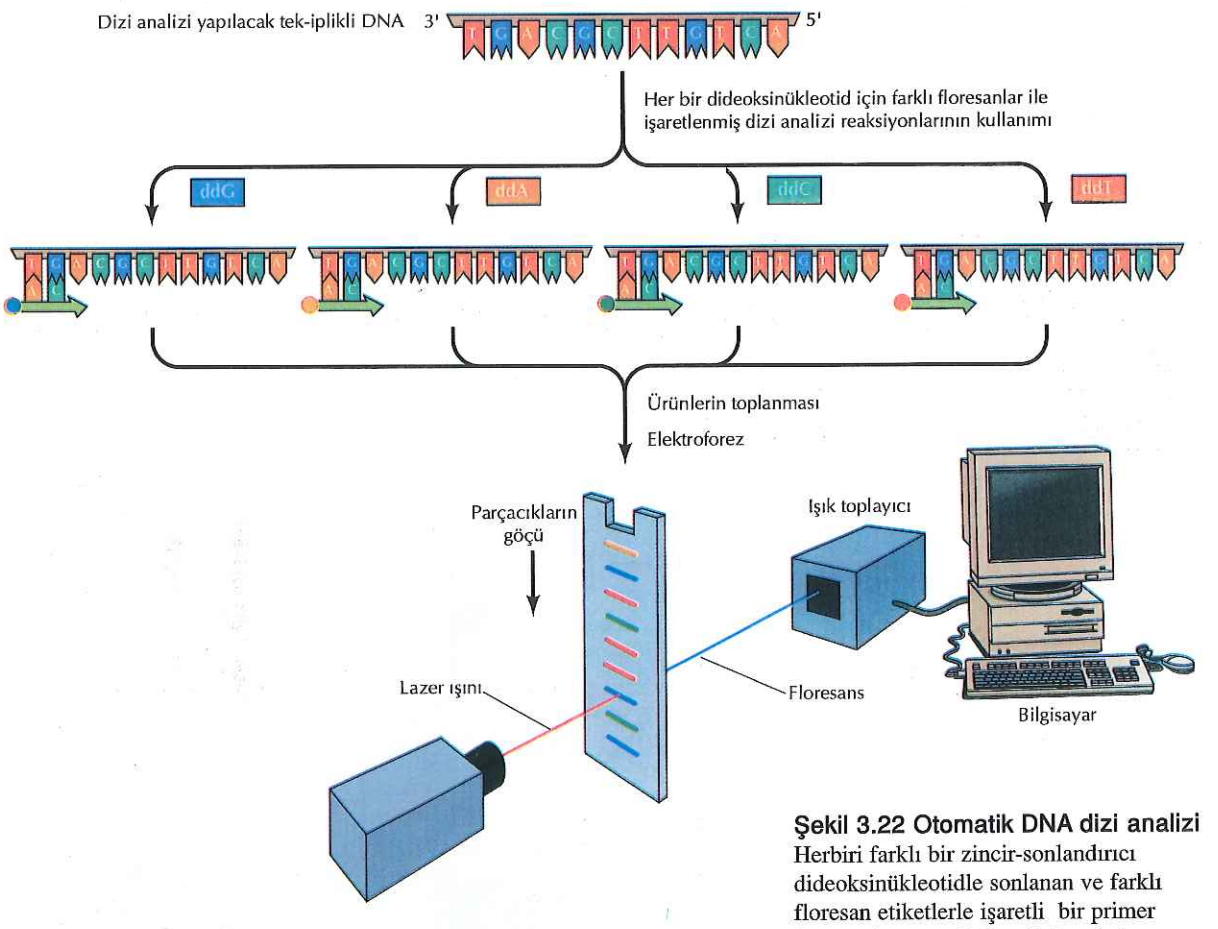
Vektör	DNA eklentisi (kb)	Konakçı hücre
Kozmidler	30-45	*E.coli*
P1 Bakteriyofajı	70-100	*E.coli*
P1 Yapay Kromozomları (PAC)	130-150	*E.coli*
Bakteri Yapay Kromozomları (BAC)	120-300	*E.coli*
Maya Yapay Kromozomları (YAC)	250-400	Maya



Şekil 3.21 Sanger Yöntemi ile DNA dizi analizi
Deoksiriboz şekerin 2' ve 3' konumunda OH gruplarından yoksun olan dideoksinükleotidler, DNA sentezini özgün bazlardan sonlandırmak için kullanılırlar. Bu moleküller, normal olarak uzayan DNA zincirlerinin içine katılır ve 3'-OH gruplarından yoksun oldukları için, bir sonraki nükleotid ilave edilemez ve dolayısıyla DNA ipliğinin sentezi sonlanır. DNA sentezi radyoaktif bir primerle başlatılır. Dört ayrı reaksiyon gerçekleşir, her bir reaksiyonda bir dideoksinükleotid ile karışım halinde, normal eşdeğeri ve üç diğer normal deoksinükleotid bulunur. Dideoksinükleotid bağlandığı zaman DNA sentezi durur, böylece her bir reaksiyon, radyoaktif primerden dideoksinükleotidle sonlandırılmış baza kadar devam eden bir ürünler serisini verir. Dört reaksiyon ürünü de elektroforezde ayrılır ve DNA dizisinin saptanması için otoradyografi ile analiz edilir.

olanak tanımaktadır. Böylece DNA'nın klonlanması ve dizisinin belirlenmesi, proteinleri oluşturan amino asitlerin dizisini belirlemekten daha kolay bir iş haline gelmiştir. Bir genin nükleotid dizisi, kodladığı proteinin amino asid dizisine çevrilebildiği için, protein dizi analizinin en kolay yolu klonlanmış bir genin ya da cDNA'nın dizisini belirlemektir.

DNA dizi analizinde en sık kullanılan yöntem, DNA sentezinin, DNA polimeraz reaksiyonunda zincir-sonlandırıcı **dideoksinükleotid**lerin (3'hidroksil grubunu olmayan deoksiriboz) eklenmesi ile erken durdurulması işlemidir. (Şekil 3.21) Bu işlemde DNA sentezi, bir ucundan bir radyoizotop ile işaretlenmiş primer kullanılarak başlatılır. Her birinde, normal eşleniğine ek olarak, bir dideoksinükleotid (A, C, G ya da T) içeren dört ayrı reaksiyon gerçekleştirilir. DNA sentezi ilerlerken ipliğe bir dideoksinükleotid girdiği zaman, bir sonraki nükleotide bağlantıyı sağlayacak olan 3' hidroksil grubu mevcut olmadığı için, reaksiyon durur. Böylelikle, her bir reaksiyonda, reaksiyonu durduran dideoksinükleotid bazıyla sonlanan, bir dizi farklı büyüklükte işaretli DNA parçacığı oluşur. Daha sonra, bu DNA parçacıkları jel elektroforezi kullanılarak büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılır ve X-ışını filmi kullanılarak resimlenir **(otoradyografi).** Her bir parçacığın büyüklüğü ucundaki



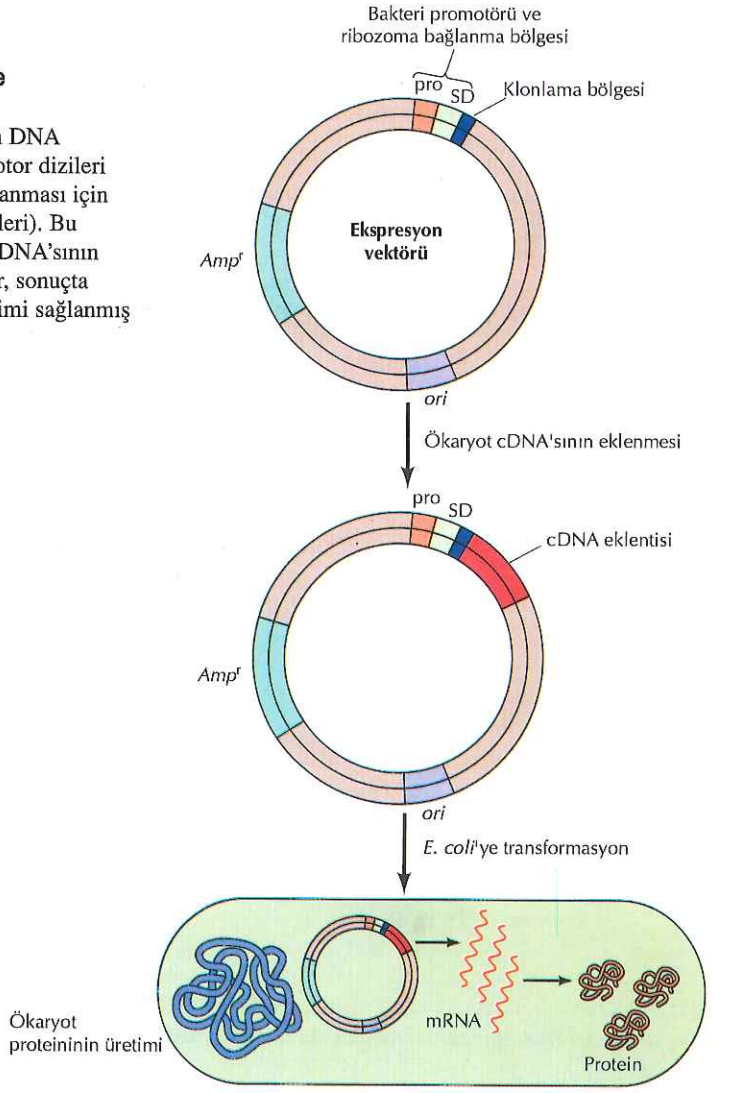
Şekil 3.22 Otomatik DNA dizi analizi Herbiri farklı bir zincir-sonlandırıcı dideoksinükleotidle sonlanan ve farklı floresan etiketlerle işaretli bir primer içeren, dört ayrı dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilir. Ürünler daha sonra bir havuzda toplanır ve jel elektroforezine tabi tutulur. DNA iplikleri jel buyunca ilerlerken, floresanı uyaran bir lazer ışığının önünden geçirilir. Yansıyan ışık, veriyi toplayıp analiz eden bir bilgisayarla bağlantılı bir fotoçoğaltıcı aracılığı ile saptanır.

dideoksinükleotid tarafından belirlendiği için, jel üzerinde yer alan parçacıkların sırası DNA dizisine karşılık gelir.

Büyük ölçekli DNA dizi analizi genellikle, dideoksinükleotid dizileme reaksiyonunda floresan işaretli primerlerin kullanıldığı otomatik sistemler ile yapılır (Şekil 3.22). Yeni sentezlenen DNA iplikleri jel elektroforezinde yürürken, DNA'lar, floresanı uyaran bir laser ışını önünden geçer. Geri gelen ışık bir fotoçoğaltıcı tarafından tutulur ve bir bilgisayarda toplanan veriler analiz edilir. Bu tip otomatik DNA dizi analizi, insan genomunun tüm dizisini çıkarmaya yönelik büyük ölçekli dizi analizine olanak sağlamasının yanı sıra, bakteri, maya, *Arabidopsis*, *C. elegans*, *Drosophila* ve fare gibi çok sayıda canlının genom dizilerinin belirlenmesini de sağlamıştır.

Klonlanmış Genlerin Ekspresyonu

Moleküler klonlama, genlerin nükleotid dizilerinin -dolayısıyla kodladıkları proteinlerin amino asit dizilerinin- saptanması olanağına ek olarak, işlevsel ve yapısal tanımlanma çalışmalarında kullanılmak üzere, bol miktarda protein elde edilmesini de olanaklı kılmıştır. Pek çok protein, ökaryot hücrelerde çok düşük seviyelerde bulunduğu için, bilinen biyokimyasal yöntemlerle yeterli miktarlarda izole edilemezler. Bu problem geni klonlanmış bir proteinin, hem bakteri



Şekil 3.23 Klonlanmış genlerin bakteride ekspresyonu
Ekspresyon vektörleri, bakteri içine yerleştirilen DNA parçasının transkripsiyonunu yönlendiren promotor dizileri (pro) ve mRNA'nın bakteriyel ribozomlara bağlanması için gerekli dizileri içerir (Shine-Delgarno [SD] dizileri). Bu dizilere komşu olarak yerleştirilen ökaryot bir cDNA'sının *E.coli*'de etkin bir biçimde ekspresyonu sağlanır, sonuçta transforme bakteride ökaryot proteinlerinin üretimi sağlanmış olur.

hem de ökaryot hücrelerde yüksek seviyede gen ekspresyonuna olanak veren vektörlerin kullanımı ile çözülebilmiştir.

Bir ökaryot geninin *E.coli*'de ekspresyonunun sağlanması için, ilgili genin cDNA'sı, eklenen genin transkripsiyon ve proteine çevrimini yönlendirecek diziler içeren, bir plazmid veya faj vektöre klonlanır (**ekspresyon vektörü**) (Şekil 3.23). Klonlanan genin ekspresyonu ile oluşan ürün, toplam bakteri proteinlerinin %10'una karşılık gelecek kadar yüksek olabilir. Bu durumda klonlanmış gen tarafından kodlanan proteini, ayrıntılı biyokimyasal ve yapısal çalışmalarda kullanmaya yetecek oranda saflaştırmak daha sıradan bir işlemdir.

Klonlanmış bir genin yüksek düzeyde protein eksprese etmesi için, ökaryot hücreler bakteri hücresinden daha uygun bir modeldir. Bu tip ekspresyon, örneğin proteinin translasyon sonrası normalde yapılan modifikasyonlarının (karbohidrat ve lipidlerin eklenmesi gibi) yapıldığından emin olmak açısından önemli olabilir. Ökaryot hücrelerde bu gibi protein ekspresyonları, klonlanmış genin yüksek seviyede gen ekspresyonunu yönlendirecek bir vektörün (genellikle bir virustan türeyen) içine yerleştirilmesi ile, *E.coli*'deki gibi başarıyla gerçekleştirilebilir. Ökaryot hücrelerinde protein ekspresyonu için sıkça kullanılan bir sistem, böcek hücrelerinin **bakulovirus** vektörleri

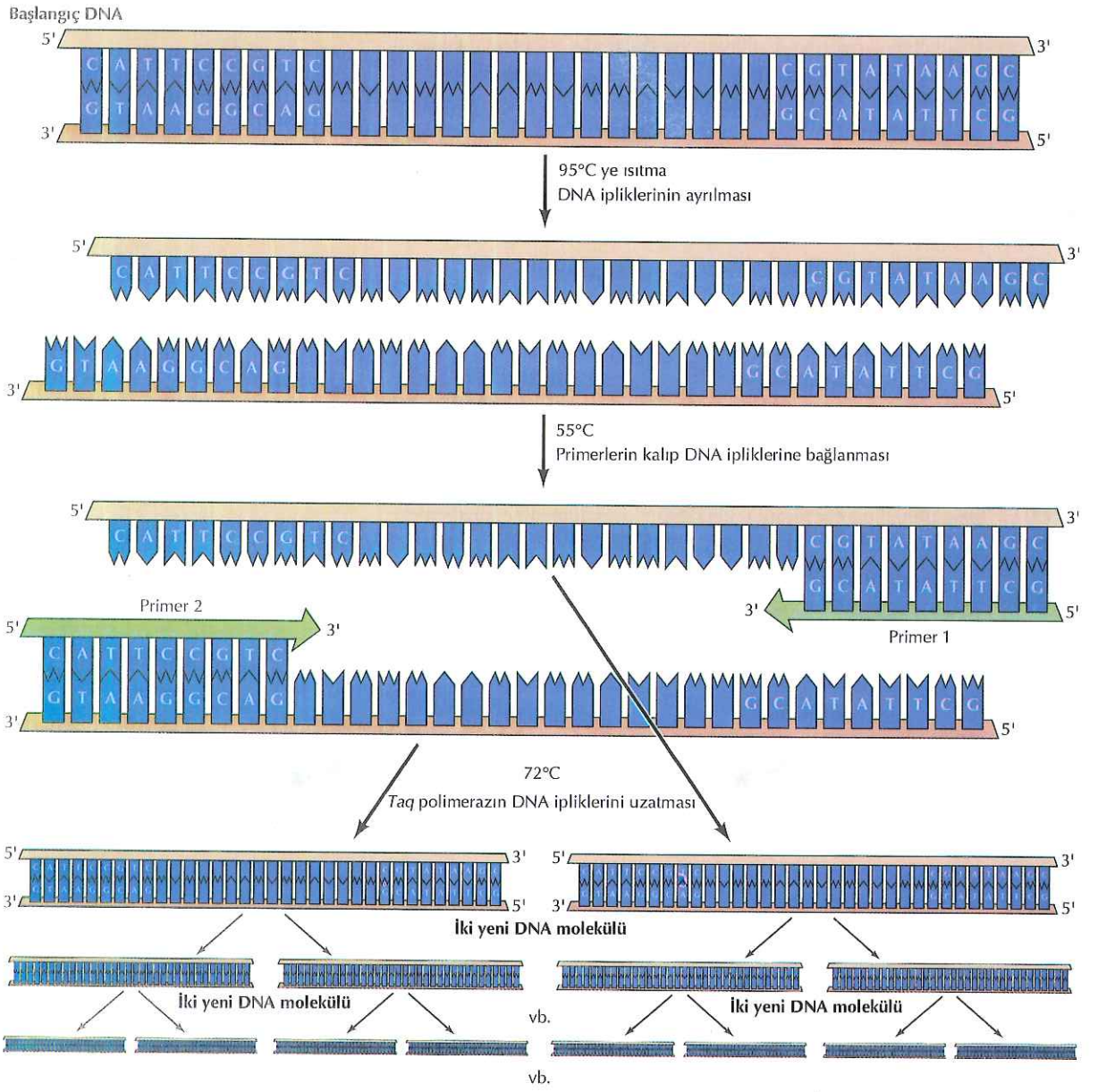
ile enfekte edilmesidir. Bu sistem, viral bir yapısal proteinin içine yerleştirilmiş olan genlerin, yüksek miktarlarda ekspresyonunu sağlamaktadır. Alternatif olarak, uygun vektörlerin kullanılmasıyla da memeli hücrelerinde yüksek miktarlarda protein ekspresyonu elde edilebilir. Klonlanmış genlerin mayada ekspresyonu, klonlanmış proteinlerin diğer proteinlerle ya da özgün DNA dizileri ile etkileşimlerinin incelenebilmesi için, maya genetiğinin basit metodlarını kullanabilmesi açısından, özellikle uygun bir sistemdir.

DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu

Moleküler klonlama, DNA parçacıklarının bakteride çoğaltılmasına ve büyük miktarlarda izole edilmelerine olanak vermektedir. DNA molekülünün büyük miktarlarda elde edilmesi için kullanılan alternatif bir yöntem de, 1988'de Kary Mullis tarafından geliştirilen **polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR).** PCR, dizinleri bilinen DNA moleküllerinin, tamamen *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlar ile büyük miktarlarda amplifikasyonunu sağlamaktadır. Aslında, DNA'nın tanımlanan parçacığının tekrarlayan kopyalarının çıkarılması için DNA polimeraz kullanılmaktadır. DNA'nın her bir replikasyon döngüsünde iki katına çıkması ile DNA moleküllerinin sayısı eksponansiyel olarak artar, böylece başlangıçtaki az miktarda kalıp DNA'dan yeterli miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin, 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 2^{30} adet (yaklaşık 1 milyar) yeni molekül elde edilecektir. Bu yüzden tek bir DNA molekülünün amplifikasyonu ile, moleküler klonlama ya da restriksiyon enzim kesimi veya nükletotid dizi analizi gibi daha ileri analizler için gereken miktarlarda DNA elde edilebilir.

DNA'nın PCR amplifikasyonunun genel basamakları Şekil 3.24'de şematize edilmiştir. Başlangıç molekülü, klonlanmış bir DNA parçacığı ya da bir DNA karışımı-örneğin insan hücrelerinden elde edilen toplam DNA olabilir. Bu karışımdaki DNA'nın özgün bir bölgesi amplifiye edilebilir, bunun için bu bölgeyi çevreleyen nükleotid dizinlerinin bilinmesi ve kopyalama işlemini başlatacak olan primerlerin bu dizilere özgün olması gerekmektedir. Primerler, genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15-20 bazlık DNA oligonüklotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezini başlatabilmek için, iki adet primer kullanılır. Reaksiyona kalıp DNA'nın iki ipliğini ayırmak için yüksek sıcaklığa (örn., 95°C) çıkılarak başlanır. Sıcaklık daha sonra, primerlerin kalıp üzerinde kendilerine karşılık gelen diziler ile eşleşmeleri için düşürülür. DNA polimeraz, her iki iplikte de kalıba tamamlayıcı yeni bir iplik sentezlemek için primerleri kullanır. Bu yüzden, işlemin bir amplifikasyon döngüsünde, bir kalıp molekülden iki yeni DNA molekülü sentezlenir. Her replikasyon döngüsünde DNA molekülünün iki kat artışı ile sonuçlanan bu işlem, pek çok kez tekrarlanabilir.

PCR işlemindeki çoklu ısıtma ve soğutma döngüleri, sıcaklık döngüleyici (thermocycler) denilen, programlanabilir ısıtma blokları ile sağlanır. Bu reaksiyonlarda kullanılan DNA polimerazlar, 75°C civarındaki sıcaklıklarda sıcak su akıntılarında yaşayan *Thermus aquaticus* gibi bakterilerden elde edilen ve yüksek sıcaklıklarda kararlı olan enzimlerdir. Bu polimerazlar, DNA'nın çift ipliğinin birbirinden ayrılması için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda bile kararlı oldukları için, PCR amplifikasyonu hızla ve otomatik olarak uygulanabilir. PCR amplifikasyonu öncesinde cDNA sentezlemek için revers transkriptaz kullanma koşulu ile, RNA dizileri de bu yöntemle amplifiye edilebilir.



Şekil 3.24 DNA'nın PCR ile çoğaltılması
Çoğaltılacak DNA parçacığı, iki ucundan DNA sentezini başlatacak olan iki dizi ile sınırlanır. Başlangıçtaki çift iplikli DNA, ipliklerin birbirinden ayrılması için ısıtılır ve daha sonra, primerlerin (genelde 15-20 bazlık oligonükleotidler) her bir DNA ipliğine bağlanması için soğuması sağlanır. *Thermus aquaticus*'tan elde edilen DNA polimeraz (*Taq* polimeraz), primerlerden başlayarak yeni DNA ipliklerinin sentezinde kullanılır ve böylelikle iki yeni DNA molekülünün oluşumu sağlanır. İşlem her birinde mevcut DNA'nın iki katının elde edildiği, çoklu döngülerle tekrarlanır.

Bir genin DNA dizisi, primerlerin özgün olarak bağlanmasına yetecek kadar biliniyorsa, PCR amplifikasyonu, diğer moleküllerle karışmış olarak bulunan çok az miktarda DNA içeren örnekten başlayarak, kolayca saptanabilir ve kullanılabilir miktarlarda DNA elde edilmesini sağlayan çok güçlü bir yöntemdir. Örneğin, toplam genomik DNA'dan, birkaç kilobaz büyüklüğüne kadar olan, tanımlanmış DNA dizileri kolaylıkla çoğaltılabildiği gibi, toplam hücre RNA'sından tek bir cDNA izole edilebilir. Çoğaltılan bu DNA parçacıkları daha sonra, örneğin, ilgilenilen bir genin mutasyonunu saptamak gibi, ileri analizler veya uygulamalar için kullanılabilir. Bu nedenle PCR, bilinen rekombinant DNA teknikleri listesine yapılan güçlü bir katkıdır. PCR'ın gücü özellikle kalıtsal hastalıkların tanısı, gelişim sürecine katkıda bulunan genlerin ekspresyon çalışmaları ve adli tıp uygulamalarında belirgin olarak ortaya çıkmaktadır.

Nükleik Asitler ve Proteinlerin Saptanması

Moleküler klonlama alanındaki gelişim, ökaryot hücrelerden genlerin izole edilmesini ve yapılarının anlaşılmasını sağlamıştır. Genlerin hücre içindeki rollerinin anlaşılması, her bir genin ve bunların kodladıkları proteinlerin hücre içindeki organizasyon ve ekspresyonlarının analizini gerektirmektedir. Bu bölümde, belirli nükleik asit ve proteinlerin saptanması için kullanılan yöntemlerin temel özellikleri anlatılacaktır. Bu yöntemler, genlerin yerleşik olduğu kromozom bölgelerinin saptanması, gen ekspresyonlarının analizi ve proteinlerin hücre içi organellerindeki yerleşimlerinin bulunmasını da içeren çok sayıda farklı çalışmalar için önemlidir. Aynı temel prensipler, belirli genlerin moleküler klonlar halinde elde edilmesinde de kullanılabilir.

Nükleik Asit Hibridizasyonu

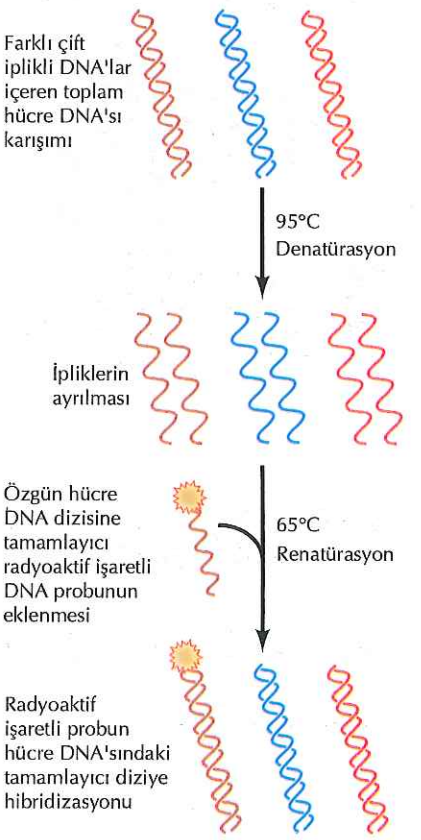
Özgün nükleik asit dizilerinin belirlenmesindeki en önemli aşama, RNA veya DNA'nın tamamlayıcı iplikleri arasındaki baz eşleşmeleridir. Yüksek sıcaklıklarda (örn., 90-100°C) DNA'nın iki tamamlayıcı ipliği birbirinden ayrılır (denatüre olur) ve tek iplikli moleküller elde edilir. Bu DNA iplikleri uygun koşullarda (örn., 65°C) inkübe edilecek olursa, tamamlayıcı baz eşleşmeleri yaparak, tekrar çift-iplikli forma dönüşürler. Bu olaya **nükleik asit hibridizasyonu** adı verilir. Nükleik asit hibridleri iki DNA ipliği arasında oluşabileceği gibi, iki RNA ipliği ya da bir DNA bir de RNA ipliği arasında da oluşabilir.

Nükleik asit hibridazyonu, viral genom veya klonlanmış bir DNA dizisi gibi, izole edilmiş nükleik asit dizilerine özgün DNA ve RNA dizilerini saptamada bir anlam ifade eder (Şekil 3.25). Klonlanmış DNA, genelde radyoaktif nükleotidlerin varlığında sentezlenerek, radyoaktif olarak işaretlenir. Bu radyoaktif DNA, homolog olduğu DNA ya da RNA dizileri ile hibridize olarak, çift iplikli hibridlerde radyoaktivitenin saptanabilmesini sağlayan **prob** olarak kullanılır.

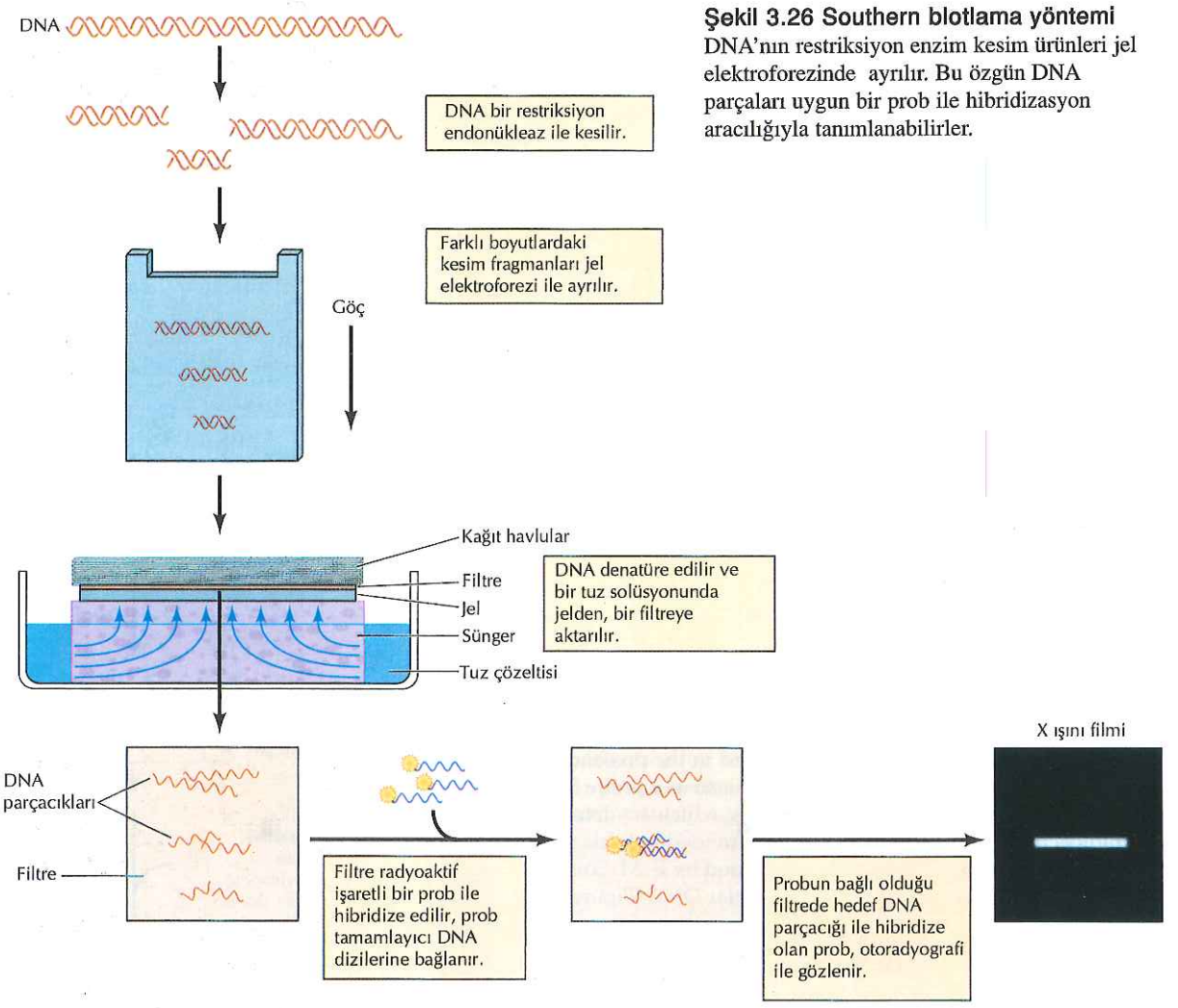
Southern blotlama (E.M. Southern tarafından geliştirilen bir yöntem), hücresel DNA'daki özgün genlerin saptanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Şekil 3.26). Analiz edilecek olan DNA, restriksiyon endonükleazlar ile kesilir ve oluşan DNA parçacıkları jel elektroforezi kullanılarak birbirinden ayrılır. Bu jel daha sonra, nitrosellüloz bir filtre ya da naylon bir zar üzerine aktarılır ve böylece DNA parçacıklarının zara geçmesi ile (blotlama) jelin tam bir kopyası elde edilir. Bu filtre daha sonra, eşleniği olan DNA dizisine bağlanmaya hazır radyoaktif işaretli- DNA probu ile inkübe edilir ve X-ışını filmi ile karşılaştırılarak görüntülenir.

Northern blotlama yöntemi Southern blotlama yönteminin (dolayısıyla isminin) DNA yerine RNA saptanması için kullanılan farklı bir uygulamasıdır. Bu yöntemde, toplam hücre RNA'sı elde edilir ve jel elektroforezi yardımı ile büyüklük farkına göre ayrımlanır. Southern blotlama yönteminde olduğu gibi, RNA'lar bir filtreye aktarılır ve bir radyoaktif prob ile hibridize edilerek saptanır. Northern blotlama sıklıkla gen ekspresyonu çalışmalarında- örneğin özgün bir mRNA'nın farklı hücrelerde var olup olmadığının araştırılmasında- kullanılır.

Southern and Northern yöntemlerinde olduğu gibi her seferinde tek bir genin analizi yerine, **DNA mikrodizin** ile hibridizasyon, binlerce genin eş zamanlı olarak analiz edilmesini sağlayabilir. Ökaryot genomunun tüm dizilimi belirlendiği için, DNA mikrodizinleriyle hibridizasyon, araştırıcıların, hem hücresel DNA hem de RNA

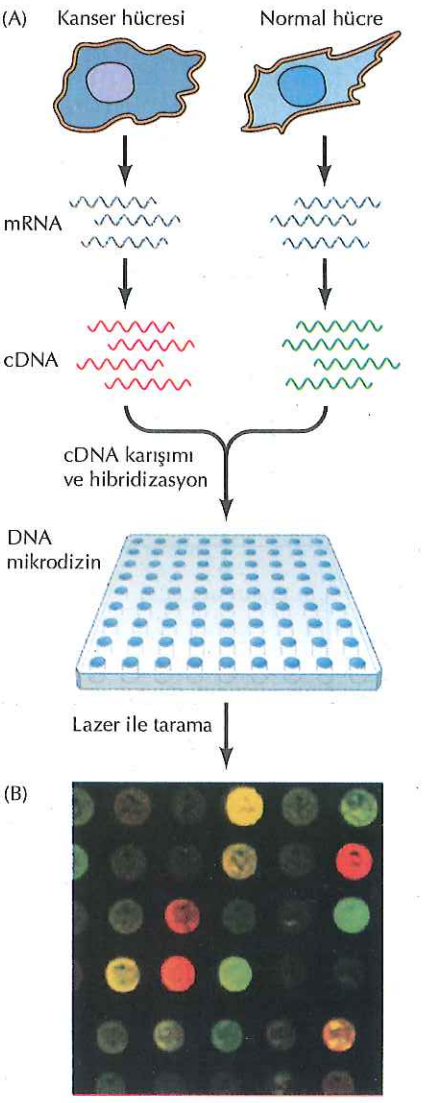


Şekil 3.25 Nükleik asit hibridizasyonu ile DNA saptanması
Toplam hücre DNA'sındaki özgün bir dizi, radyoaktif işaretli bir DNA probu ile hibridize edilerek saptanabilir. DNA, tek iplikli moleküllerin eldesi için 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. Daha sonra radyoaktif işaretli prob ilave edilir ve sıcaklık tamamlayıcı DNA ipliklerinin birbirleri ile eşleşmesine izin verecek şekilde 65°C'ye düşürülür. Radyoaktif prob hücre DNA'sındaki tamamlayıcı dizilerine bağlanır ve böylelikle radyoaktif işaretli, çift zincirli moleküller olarak saptanabilir.



Şekil 3.26 Southern blotlama yöntemi
DNA'nın restriksiyon enzim kesim ürünleri jel elektroforezinde ayrılır. Bu özgün DNA parçaları uygun bir prob ile hibridizasyon aracılığıyla tanımlanabilirler.

örneklerinde var olan dizinlerin bütünsel analizini sağlamaktadır. Bir DNA mikrodizini, üzerine cDNA parçalarının ya da oligonükleotidlerin robot aracılığı ile, yüksek yoğunlukta küçük noktacıklar halinde yerleştirildiği bir cam düzlem veya zar filtreden oluşur (Şekil 3.27). Bu dizindeki her bir nokta tek bir oligonükleotid veya cDNA içerir. Tipik bir mikroskop lamının üzerine 10,000 farklı, özgün DNA dizisinin yerleştirilebildiği göz önüne alındığında, hücresel genomdaki tüm genleri temsil eden dizinleri içeren bir DNA mikrodizin hazırlanması olasıdır. Şekil 3.27'de gösterildiği gibi, DNA mikrodizinlerin en yaygın olarak kullanıldığı uygulamalardan birisi de, gen ekspresyonu çalışmalarıdır-örneğin iki farklı hücre tipinde eksprese edilen genlerin karşılaştırılması. Bu tip deneylerde, her iki hücre tipinde (örn., normal ve kanser hücreleri) eksprese edilen mRNA'lardan cDNA probları sentezlenir. Bu iki cDNA farklı renklerde (genelde yeşil ve kırmızı) floresan boyalar ile işaretlenir ve bu cDNA karışımı, üzerinde noktacıklar halinde 10,000 ya da daha fazla insan geni yerleştirilmiş olan bir DNA mikrodizini ile hibridize edilir. Bu dizin daha sonra yüksek-ayırım gücünde lazer tarayıcı ile analiz edilir ve dizin üzerindeki uygun noktalarda yeşil-kırmızı florasanın oranına bakılarak, her bir genin transkripsiyonunun normal hücrelere oranla kanser hücrelerindeki göreceli değişimi belirlenir.



Şekil 3.27 DNA mikrodizinleri
(A) Kanserli hücreler ile normal hücreler arasındaki gen ekspresyonunun karşılaştırmalı analizine bir örnek. Kanser hücrelerinden ve normal hücrelerden elde edilen mRNA'lar farklı floresan boyalar (örn., kanser hücre cDNA'larını işaretlemek için kırmızı ve normal hücre cDNA' ları için yeşil floresan boyalar) ile işaretlenmiş cDNA problarının sentezi için kalıp olarak kullanılır. Daha sonra iki cDNA probu karıştırılır ve 10,000 veya daha fazla farklı insan genini temsil eden oligonükleotid noktaları içeren bir DNA mikrodizin ile hibridize edilir. Her genin kanserli hücrelerde ve normal hücrelerdeki göreli ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak, mikrodizin üzerindeki her yerleşim için kırmızı ve yeşil floresans oranı elde edilir. (B) Bir mikrodizinin bir bölgesinin fotoğrafı.

Nükleik asit hibridizasyonu, sadece hücre özütlerindeki homolog DNA ya da RNA dizilerini saptamada değil, aynı zamanda -***in situ* hibridizasyon** olarak adlandırılan bir yöntemle, kromozomlar ya da bütünlüğünü koruyan hücrelerde de kullanılabilir. (Şekil 3.28). Bu durumda, bir hücre ya da hücreyi oluşturan alt elemanlardan birine özgün olarak hazırlanan radyoaktif ya da florasan prob ile hibridizasyon, mikroskopik olarak incelenir. Örneğin, ilgilenilen bir genin kromozom üzerindeki yerleşimini belirlemek için işaretli prob, bütünlüğü bozulmamış kromozomlar ile hibridize edilebilir. *In situ* hibridizasyon, bir dokudaki farklı hücre tiplerinde özgün bir mRNA'ların saptanması için de kullanılabilmektedir.

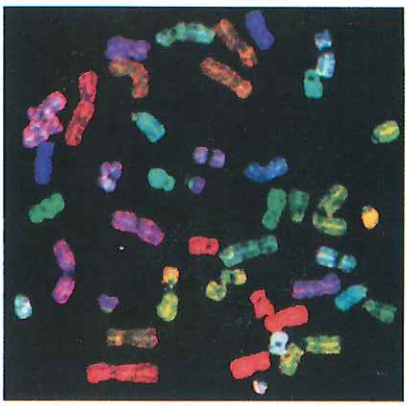
Küçük Miktarlarda DNA veya RNA'nın PCR Yöntemi ile Saptanması

DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu, hücresel DNA veya RNA'nın saptanması için, Northern veya Southern yöntemlerinden çok daha duyarlı bir yöntemdir. Blot hibridizasyon yönteminde nükleik asitlerin saptanabilmesi için, yaklaşık olarak, 100,000 DNA ya da RNA kopyasına gereksinim vardır. Bunun aksine, PCR ile, tek bir kopya DNA (ya da revers transkriptaz ile oluşan RNA) bile saptanabilir düzeyde çoğaltılabilir.

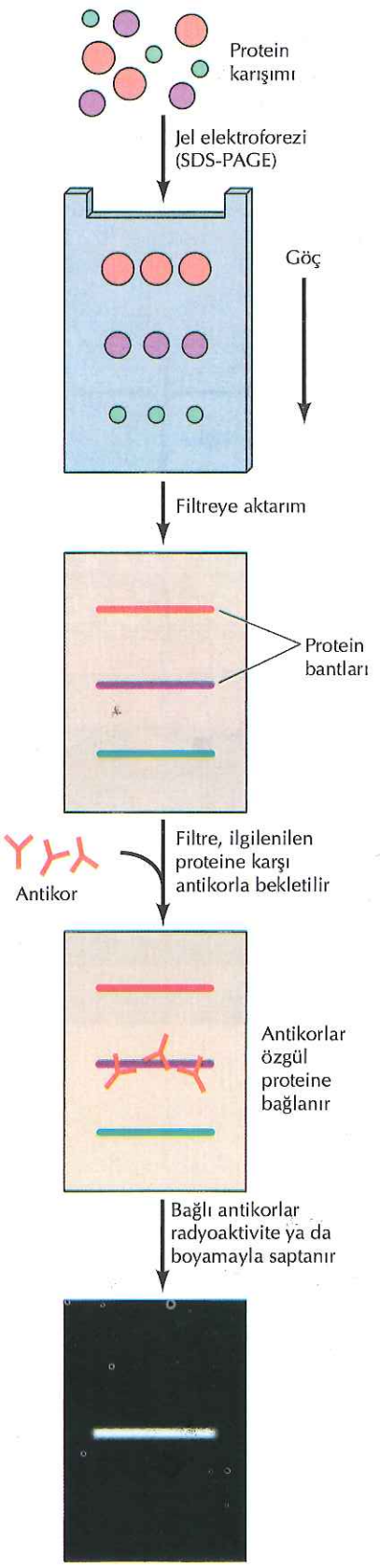
Daha önce değinildiği gibi, PCR'da reaksiyonun özgüllüğü, kalıp molekülün benzer dizilerine hibridize olan oligonükleotid primerlerin kullanılması ile sağlanır. Bu nedenle PCR ile, toplam hücre DNA veya RNA'ları gibi kompleks karışımlardaki özgün bir DNA molekülünün, seçici olarak çoğaltılması sağlanabilir. Sonuçta, PCR amplifikasyonu, tek bir hücre özütü gibi çok küçük miktarlarda başlangıç örneğinden, hedeflenen DNA veya RNA'nın elde edilmesinde kullanılabilir. Başka yöntemlerde pek rastlanmayan bu özgünlük PCR'ı, hücrelerde az miktarda mevcut olan gen ekspresyonlarının belirlenmesini de içeren, pek çok farklı uygulamada kullanılan önemli bir yöntem yapmıştır.

Protein Probları Olarak Antikorlar

Gen ekspresyonu ve işlevinin incelenmesinde, DNA ve RNA'nın saptanması yanı sıra özgün proteinlerin de incelenmesine gerek vardır. Bu tip çalışmalarda, bir protein molekülü ile seçici olarak etkileşen **antikorlar,** işaretli nükleik asit problarının yerini alır. Antikorlar, bağışıklık sistemi hücreleri (B lenfositler) tarafından üretilen ve konakçı hücrenin yabancı cisim olarak tanıdığı-örneğin bir virusun zarf proteinleri gibi, moleküllerle (**antijenler**) etkileşen proteinlerdir. Omurgalıların bağışıklık sistemi, her biri tek bir özgün antijeni (protein ya da karbohidrat veya biyolojik olmayan moleküller olabilir) tanıyabilecek, milyonlarca farklı antikor üretebilecek kapasitededir.



Şekil 3.28 Florasan *in situ* hibridizasyon
Yirmidört kromozomun her birini ayrı renkte boyayan kromozoma-özgü floresan problar ile insan kromozomlarının hibridizasyonu (National Cancer Institute'den Thomas Reid ve ve Hesed Padilla-Nash'in izni ile kullanılmıştır).



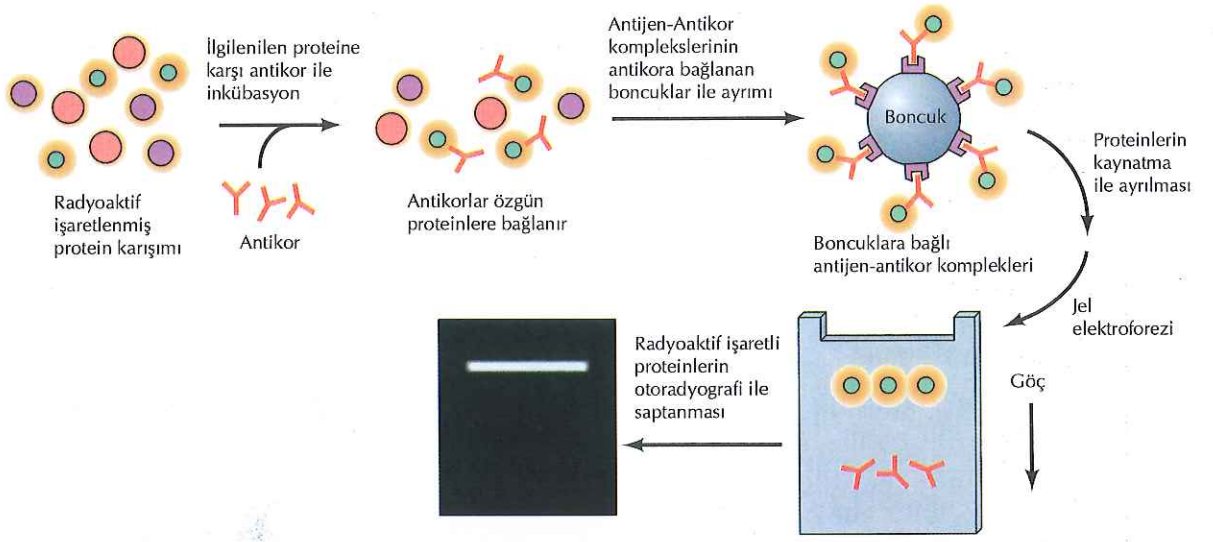
Her bir lenfosit sadece tek bir tip antikor üretir, ancak bağışıklık sisteminin gelişimi sırasındaki programlanmış gen düzenlenmeleri sonucunda, farklı lenfositlerin antikor kodlayan genleri farklıdır (bkz. Bölüm 5). Bu çeşitlilik farklı, antijenlere yanıt verebilmek için programlanmış, farklı antikor genlerini taşıyan bir lenfosit dizininin oluşumunu sağlar.

Antikorlar, bir hayvanın yabancı bir proteinle karşılaşması ile elde edilebilir. Örneğin, insan proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar sıklıkla, tavşanlardan üretilir. Bu gibi bağışık (immünize) hayvanların serumları, immünize edici antijen üzerindeki pek çok farklı bölge ile reaksiyona giren bir antikor karışımı (farklı lenfositler tarafından üretilen antikorlardan oluşan) içerir. Bununla birlikte, bağışık hayvanlardan (genellikle fareler) elde edilen klonal B lenfosit dizilerinin kültürü ile, tek tür antikorlar (**monoklonal antikorlar**) da üretilebilir. Her lenfosit sadece bir tip antikor üretmeye programlanmış olduğu için, tek bir lenfosit klonundan elde edilen hücre dizisi yalnızca tek bir antijenik bölgeyi tanıyan monoklonal antikorlar üreteceği için, özgünlüğü çok yüksek immmünolojik ayıraçlar elde edilecektir.

Antikorlar, hücrelerden saflaştırılan proteinlere karşı sentezlenebildikleri gibi, bağışıklık için diğer maddeler de kullanılabilir. Örneğin hayvanlar, kanser hücreleri gibi özgün bir hücre tipi tarafından eksprese edilen, bilinmeyen proteinlere karşı antikor üretmek üzere, bütün halindeki hücrelerle de immünize edilebilir. Bu gibi antikorlar, immünizasyon için kullanılan hücre tipinin ürettiği özgül proteinleri saptamak için kullanılabilir. Buna ek olarak, rekombinant bakteri klonlarının eksprese ettiği proteinlere karşı da antikorlar elde edilebilir. Bu yolla, moleküler klonlama, ökaryot hücrelerden elde edilmesi zor olan proteinlere karşı antikorların oluşturulmasına da yardımcı olur. Ayrıca antikorlar, bir proteinin tamamına karşı değil, 10-15 amino asitten oluşan sentetik peptitlere karşı da oluşturulabilir. Böylelikle bir genin DNA dizisi bilindiğinde, bu genin olası protein dizisi kullanılarak sentezlenen peptidlere karşı antikorlar oluşturulabilir. Bu sentetik peptitlere karşı sentezlenmiş olan antikorlar, sıklıkla, proteinin tamamına karşı da reaksiyon verdiği için, sadece klonlanmış bir gen dizisinden başlayarak, bir proteine karşı antikorlar üretmek mümkündür.

Antikorlar, hücre özütlerindeki proteinlerin saptanması için birçok farklı şekilde kullanılabilir. Bunlardan en çok kullanılan iki tanesi **immünblotlama (Western blotlama** olarak da adlandırılır) ve **immün çöktürme**'dir. Western blotlama (Şekil 3.29), Southern blotlama yönteminin bir diğer çeşitlemesidir. Hücre özütlerindeki proteinler, ilk olarak, jel elektroforezi aracılığı ile büyüklüklerine göre ayrılır. Proteinler farklı şekil ve farklı elektrik yüklerine sahip olduğu için, bu süreç nükleik asit elektroforezi için kullanılan yöntemde bazı değişikliklerin yapılmasını gerektirir. Proteinler, **SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)** olarak bilinen ve proteinlerin, negatif yüklü bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren bir çözelti içinde çözündüğü bir yöntemle ayrıştırılırlar. Her bir protein, proteini denatüre eden ve proteinin tamamına negatif yük veren, çok sayıda deterjan molekülüne bağlanır. Bu koşullar altında proteinlerin tamamı pozitif elektroda doğru göç ederler-göç hızları sadece büyüklükleri ile

Şekil 3. 29 Western blotlama
Proteinler SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılırlar ve jelden filtreye aktarılırlar. Filtre, saptanmak istenen proteine özgül antikorlar ile inkübe edilir. Filtreye tutunan antikor, antikora bağlanan radyoaktif prob gibi farklı ajanlar ile reaksiyonla saptanır.



Şekil 3.30 İmmünçöktürme
Radyoaktif olarak işaretlenmiş proteinler, yönlendirildiği protein (antijen) ile kompleks oluşturacak antikorlar ile inkübe edilir.Bu antijen-antikor kompleksleri antikora bağlanan boncuklar üzerinde toplanır. Kaynatma işlemi ile antijen-antikor komplekslerinin boncuklardan ayrılması sağlanır ve ayrılan proteinler SDS-poliakrilamit jel elektroforezinde analiz edilir. İmmünçöktürme ile izole edilen radyoaktif proteinler otoradyografi ile belirlenir.

belirlenir (nükleik asitlerde olduğu gibi). Elektroforez işleminden sonra, proteinler, ilgilenilen proteinlere karşı antikorlar ile reaksiyona girebilecekleri bir filtreye aktarılır. Filtreye tutunan antikorun farklı yöntemler kullanılarak saptanması ile, antikorun hedeflediği proteinin de belirlenmesi sağlanmış olur.

İmmün çöktürme işleminde ise, antikorlar hedef proteinlerin izole edilmesinde kullanılır (Şekil 3.30). Hücreler ilk olarak, içerdikleri proteinlerin işaretlenmesi için, radyoaktif amino asitlerle inkübe edilir. Bu şekilde radyoaktif olarak işaretlenmiş hücre özütleri, daha sonra özgün antijenik hedef proteine bağlanacak olan bir antikor ile inkübe edilir. Sonuçta oluşan antijen-antikor kompleksi ayrılır ve elektroforez işlemi uygulanır ve radyoaktif işaretli antijen otoradyografi ile saptanır.

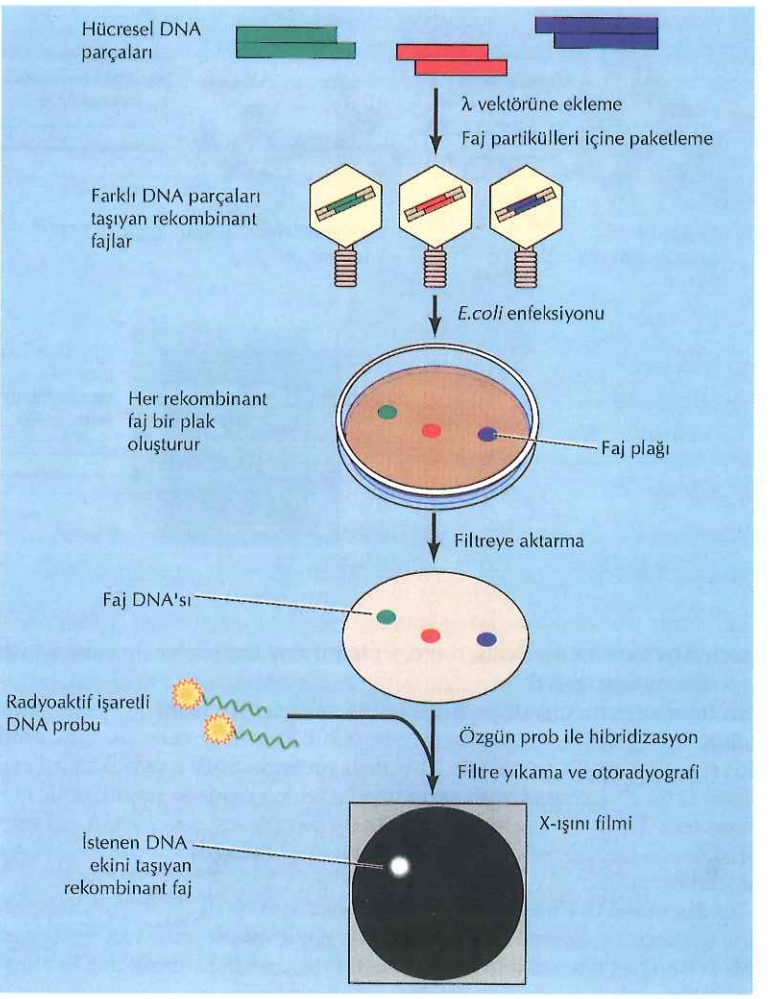
Bölüm 1'de tartışıldığı gibi antikorlar, parçalanan hücrelerde olduğu kadar, bütünlüğü bozulmamış hücreler içindeki proteinlerin görüntülenmesinde de kullanılabilirler. Örneğin, hücreler floresan boyalarla işaretlenmiş antikorlarla boyanabilir ve antijen olarak kullanılan proteinlerin hücre içi yerleşimleri floresan mikroskobu ile görüntülenebilir (bkz. Şekil 1.28). Antikorlar aynı zamanda, ağır metaller gibi, elektron mikroskobu ile görüntülenebilen belirteçlerle de işaretlenebilir ve bu etiketler, antijenik proteinlerin ayrıntılı yapısal düzeyde görüntülenmesine olanak verir.

Rekombinant DNA Kütüphanelerinin Taranmasında Kullanılan Problar

Hücre özütlerindeki nükleik asit ve proteinleri saptamada kullanılan temel yöntemler, özgün hücresel DNA parçacıklarını içeren moleküler klonların tanımlanmasında da kullanılır. Örneğin, nükleik asit hibridizasyonu, DNA dizisine özgü uygun prob varsa, genomik klonların veya cDNA klonlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Ekspresyon vektörlerinde klonlanmış cDNA'lar da, kodladıkları proteinlere karşı antikorlar kullanılarak saptanabilir.

Genomik ya da cDNA klonlarının izolasyonunda ilk aşama, genellikle, belli bir hücre tipine ait tüm genomik veya mRNA dizilerini içeren klonlar topluluğundan oluşan, **rekombinant DNA kütüphanelerinin** hazırlanmasıdır (Şekil 3.31). İnsan DNA'sına ait bir **genomik kütüphane,** örneğin rasgele seçilmiş, büyüklüğü ortalama

Şekil 3.31 Rekombinant kütüphanenin hibridizasyon ile taranması
Hücresel DNA parçaları bakteriyofaj λ vektörüne klonlanır ve farklı hücresel DNA'lar içeren rekombinant faj topluluğu oluşturacak şekilde, faj partikülleri içinde paketlenir. Bu fajlar bakterileri enfekte etmek için kullanılır ve kültürün üzeri bir filtre ile kaplanır. Her bir plaktaki fajların bir bölümü filtreye geçer ve filtre istenilen geni taşıyan faj plağının saptanması için, radyoaktif prob ile hibridize edilir. Daha sonra istenilen faj ana plaktan izole edilebilir.



15kb olan DNA parçalarının bir λ vektöre klonlanması ile hazırlanabilir. İnsan genomunun tamamı 3 x 10^6 kb büyüklüğünde olduğu için, genomun tamamını temsil eden bir kütüphanede 200,000 adet, bu tip λ klonu vardır. Örneklem sırasında istatistik dalgalanmalar yaşanacağı için, pek çok gen bu 200,000 rekombinant klonun içinde temsil edilmeyecek, buna karşın birçok gen de birden fazla kopya halinde bulunacaktır. Bu nedenle ilgilenilen herhangi bir genin kütüphanede temsil edilme olasılığını artırmak için, genellikle, yaklaşık 1 milyon rekombinant faj içeren daha büyük kütüphaneler oluşturulur.

Uygun probu varsa, bu gibi rekombinant kütüphanelerden istenilen herhangi bir gen izole edilebilir. Rekombinant fajlar *E.coli*'ye aktarılır ve her bir faj, bakteri kültüründe tek bir plak oluşturacak şekilde çoğaltılır. Faj plakları, Southern blotlama yönteminde DNA'nın filtreye aktarılması işleminde olduğu gibi, filtreye tutturulur ve filtreler ilgili proteinin saptanabilmesi için radyoaktif işaretli problar ile hibridize edilir. Daha sonra, istenilen hücresel DNA'yı taşıyan rekombinant faj plağı, çoğaltılmak üzere, başlangıçtaki petriden izole edilir. Benzer işlemler, plazmid DNA klonlarını taşıyan bakteri kolonilerinin taranmasında da kullanılabilir. Böylelikle özgün klonlar faj ya da plazmid kütüphanelerinden hibridizasyon yoluyla elde edilmiş olur.

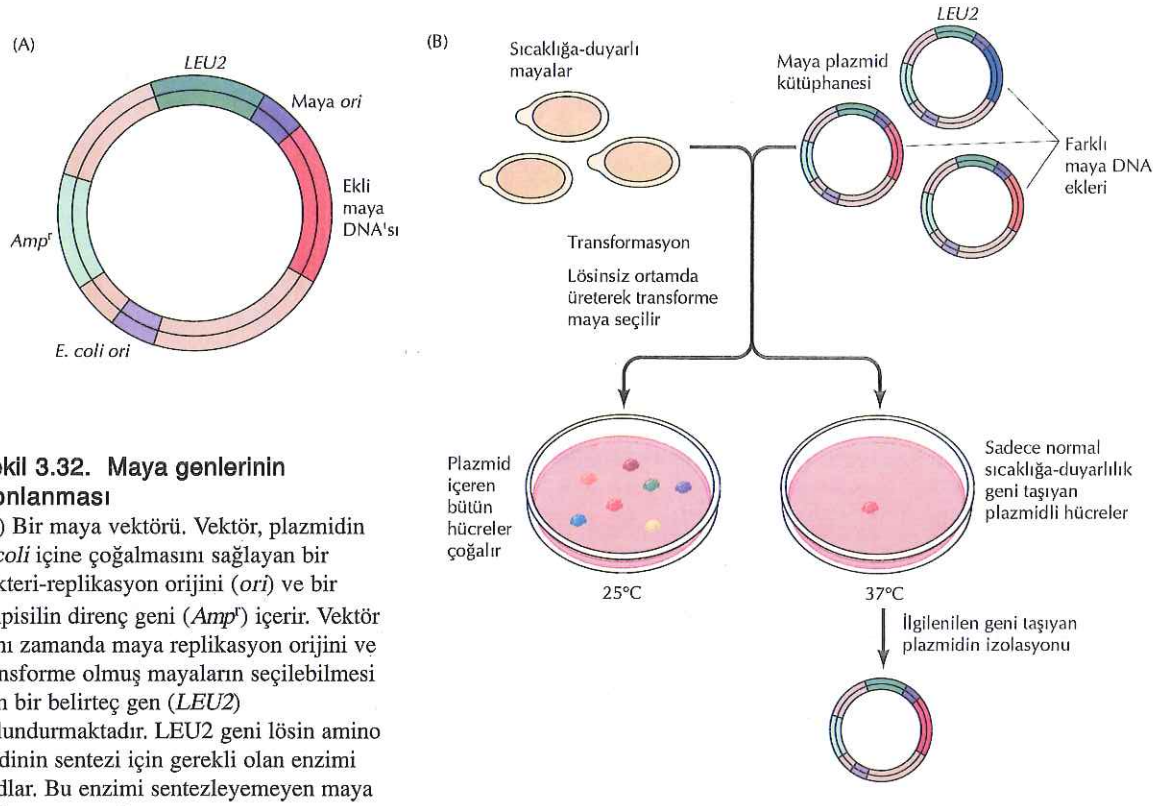
Rekombinant kütüphaneleri taramak için farklı problar kullanılabilir. Örneğin, bir cDNA klonu kendisine karşılık gelen genomik klonun eldesinde prob olarak kullanılabileceği gibi, bir türden (örn., fare) klonlanmış bir gen başka bir türe (örn., insan) ait benzer bir genin saptanmasında kullanılabilmektedir. İzole DNA parçaları yanı sıra, genlerin kodladığı proteinlerin kısmi amino asit dizilerini temel alarak hazırlanan sentetik oligonükleotidler de, genlerin saptanmasında prob olarak kullanılabilir. Örneğin hedef proteinin amino asid dizini temel alınarak, 15-20 baz büyüklüğündeki bir oligonüleotid dizisi sentezlenebilir. Bu oligonükleotidler daha sonra, cDNA klonlarının eldesinde prob olarak kullanılabilir, bu da (önceden anlatıldığı gibi) proteinin dizi analizinden ve nitelendirilmesinden çok daha kolaydır. Böylelikle, deneysel olarak, özgün kısmi peptid dizilimi kullanılarak, klonlanmış bir genden bir proteinin izolasyonunu yapabilmek olanaklı hale gelmektedir.

Protein ürününden hareketle bir genin izolasyonunu sağlamada diğer bir yaklaşım da, ekspresyon kütüphanelerini taramak için antikorların prob olarak kullanılmasıdır. Bu durumda, *E.coli*'de protein sentezini sağlayan bir ekspresyon vektörü kulanılarak bir **cDNA kütüphanesi** oluşturulur. Faj plakları veya bakteri kolonileri yukarıda tanımlandığı gibi filtreye aktarılır, ancak filtre bu kez özgün bir antikor ile işleme tabi tutulur (Western blotlamada olduğu gibi).

Moleküler klonları tanımlamak, genleri ve gen ürünlerini saptamak için yapılan bu uygulamalar, rekombinant DNA teknolojisinin esnekliğini sergilemektedir. Klonlanmış herhangi bir genden başlayarak, bu genin nükleotid dizisinin saptanması ya da bu klonları prob olarak kullanarak gen organizasyonu ya da gen ekspresyonları hakkında bilgi edinmenin yanı sıra, gen ekspresyonu ve bu genin kodladığı proteine karşı antiserum oluşturmak da olasıdır. Diğer taraftan genler, kendi ürünleri olan proteinlere ait küçük diziler esas alınarak hazırlanan oligonükleotid ya da antikor probları ile de klonlanabilir. Böylelikle rekombinant DNA teknolojisi, ökaryot genler ve kodladıkları proteinler ile yapılacak çalışmalar için, mevcut yaklaşımlara büyük bir açılım getirerek, hem DNA'dan proteine hem de proteinden DNA'ya doğru deneysel analizlerin yapılmasını olanaklı kılmıştır.

Ökaryotlarda Gen Fonksiyonu

Önceki bölümlerde tartışılan rekombinant DNA teknikleri, ökaryot genlerin izolasyonu ve yapılarının detaylı olarak anlaşılmasında güçlü teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir genin işlevinin anlaşılması için, genin sadece bakteride moleküler klonlanması yetmemekte, bütünlüğünü koruyan hücreler ve organizmalar içinde de çalışılması gerekebilmektedir. Klasik genetikte genlerin işlevlerinin anlaşılması, genellikle, mutant organizmaların değişmiş fenotiplerinin incelenmesi ile mümkündür. Rekombinant DNA'nın ortaya çıkışı, gen fonksiyon çalışmalarına yeni bir boyut getirmiştir. Klonlanmış DNA'nın tekrar ökaryot hücresi içine sokulabilmesi ile, klonlanmış bir genin işlevlerinin araştırılması mümkün olabilmiştir. Bu teknik maya gibi basit ökaryot organizmalarda, herhangi bir mutant genin moleküler klonlarının izolasyonunu olanaklı kılmıştır. Buna ek olarak fonksiyonel analiz için, klonlanmış genin hayvan veya bitki hücre kültürlerine olduğu gibi, bütünlüğü bozulmamış organizmalara da yerleştirilebildiği çeşitli yöntemler vardır. Bu uygulamalar, *in vitro* koşulda klonlanmış DNA'da mutasyon oluşturulma olanağı ile eşleştirildiğinde, rekombinant DNA çalışmalarının gücü daha karmaşık organizmaların gen fonksiyonu çalışmalarına olanak sağlayacak şekilde artar.



Şekil 3.32. Maya genlerinin klonlanması

(A) Bir maya vektörü. Vektör, plazmidin *E.coli* içine çoğalmasını sağlayan bir bakteri-replikasyon orijini (*ori*) ve bir ampisilin direnç geni (Amp^r) içerir. Vektör aynı zamanda maya replikasyon orijini ve transforme olmuş mayaların seçilebilmesi için bir belirteç gen (*LEU2*) bulundurmaktadır. LEU2 geni lösin amino asidinin sentezi için gerekli olan enzimi kodlar. Bu enzimi sentezleyemeyen maya suşlarının transformasyon sonrası seçimleri, lösinden yoksun büyüme ortamları kullanılarak yapılabilir. (B) Maya geninin izolasyonu. Tanımlanmak istenilen maya geni, mayanın 25°C sıcaklıkta ürediği, 37°C sıcaklıkta ise çoğalmanın durduğu, sıcaklığa-duyarlı mutantlar aracılığı ile seçilir. Bu gene ait klonun seçilebilmesi için sıcaklığa-duyarlı mayalar tüm maya genomuna ait farklı gen parçaları taşıyan plazmid kütüphaneleri ile transforme edilir. Plazmid DNA'ları ile transforme olan tüm mayalar 25°C sıcaklıkta, lösinsiz ortamında üreyebilme yeteneğindedirler, 37°C sıcaklıkta ise sadece genin normal kopyasını taşıyan plazmid ile transforme olmuş mayalar çoğalabilir. Bu normal geni taşıyan plazmid, permisif olmayan sıcaklıkta koloniler oluşturan transforme mayalar arasından izole edilebilir.

Mayalarda Genetik Analiz

Mayalar, ökaryotlarda moleküler biyolojik çalışmalar için özel avantajlara sahiptir (bkz. Bölüm 1). Yaklaşık 1.2×10^7 baz çifti büyüklüğünde olan *Saccharomyces cerevisiae* genomu insan genomundan yaklaşık 200 kez daha küçüktür. Buna ek olarak, mayalar, yaklaşık iki saatlik bölünme süreleri ile, kültürde kolaylıkla üreyip çoğalabilirler. Böylelikle maya, bakteriler tarafından sağlanan basit avanlajları -küçük genom ve hızlı üreme kapasitesi- ökaryot genomu için de sunmaktadır.

Mayalarda mutasyonlar *E.coli*'de olduğu kadar hızlı saptanabilir. Örneğin, çoğalmaları için özel bir amino asit veya diğer besin gerektiren mutant mayalar kolaylıkla izole edilebilirler. Bunun yanında, yaşamsal süreçler için gereken genlerinde bozukluk olan mayalar ise (metabolik eksikliklerin aksine) **sıcaklığa-duyarlı mutantlar** olarak ayrılabilirler. Bu tip mutantlar, bir sıcaklıkta işlevsel olan (permisif sıcaklık), ancak başka sıcaklıkta işlevini kaybeden (nonpermisif sıcaklık) proteinler kodlarlar, normal proteinler ise her iki sıcaklıkta da işlev görürler. Yaşamsal bir geninde sıcaklığa-duyarlı mutasyon olan bir maya, permisif sıcaklıkta üreyebilme özelliği ile ayırt edilebilir. Bu tip sıcaklığa-duyarlı mutantların izole edilebilmesi, RNA sentezi ve işlenmesi, hücre döngüsü ve hücre bölümleri arasında proteinlerin taşınması gibi, yaşamsal öneme sahip maya genlerinin saptanmasını sağlamıştır.

Maya'nın göreceli olarak daha basit olan genetiği, işlevsel aktivitesine bakılarak, herhangi bir maya mutasyonundan sorumlu genin klonlanabilmesini sağlar (Şekil 3.32). Öncelikle, normal maya DNA'sı genom kütüphanesi, *E.coli*'de olduğu gibi mayalarda da çoğalabilen vektörler kullanılarak hazırlanmıştır. Maya genomu boyutunun küçük olması, tüm maya genlerini içeren bir kütüphanenin birkaç bin plazmid tarafından oluşturulacağı anlamına gelmektedir. Bu tip plazmidlerden oluşan karışım, daha sonra, sıcaklığa-duyarlı

mayaları transforme etmek için kullanılır ve transformasyon gösteren mutantlardan nonpermisif sıcaklıkta çoğalabilenler seçilir. Bu transforme mayalardan, plazmid DNA'sı üzerinde ilgili genin normal kopyasını taşıyanlar, kolayca izole edilerek ileri çalışmalar için kullanılabilir.

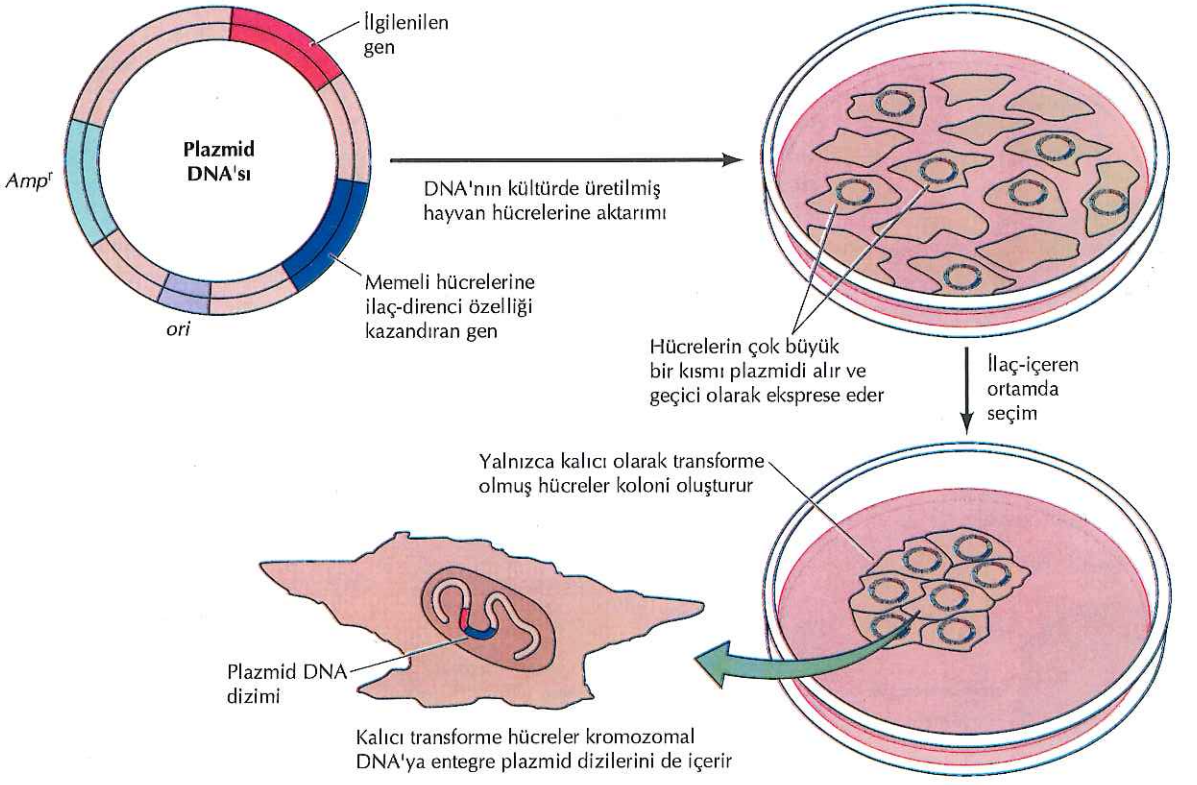
Maya'da yaşamsal öneme sahip çok sayıda gen bu şekilde tanımlanmıştır. Pek çok olguda, mayalardan izole edilen bazı genler, memeli hücrelerinde benzer genlerin klonlanmasına da yardımcı olmuştur. Böylelikle, mayaların basit genetiği sadece ökaryot hücre için önemli bir model olmakla kalmayıp, çok daha karmaşık yapıdaki ökaryotlarda da benzer genlerin klonlanmasına yol açmıştır.

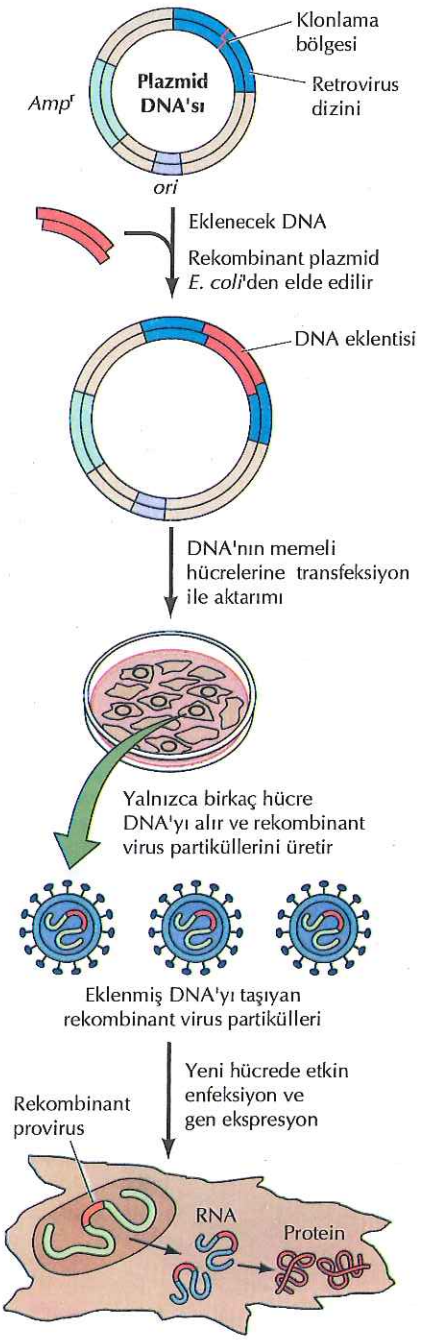
Hayvan ve Bitkilerde Gen Aktarımı

Karmaşık yapıdaki ökaryot hücreleri, mayalarda kolaylıkla uygulanabilen basit genetik işlemler için uygun olmamakla birlikte, gen işlevleri klonlanmış DNA'nın hayvan ya da bitki hücrelerine aktarılması ile çalışılabilir. Bu tip deneylerin (**gen aktarımı** olarak adlandırılır), gen ekspresyonu ile protein işlenmesi mekanizmalarını da içeren, çok sayıda soruyu cevaplamak için kritik olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, bu kitabın sonraki bölümlerinde tartışılacağı gibi, gen aktarımı insan kanser hücrelerinin anormal şekilde çoğalmasından sorumlu bir dizi geni de kapsayacak şekilde, hayvan hücre çoğalma ve farklılaşmasını denetleyen genlerin belirlenmesini ve nitelendirilmesini olanaklı kılmıştır.

DNA'nın hayvan hücrelerine verilmesi yöntemi, başlangıçta enfeksiyöz viral DNA'lar kullanılarak geliştirildiği için, bu işlem **transfeksiyon** (*trans*formasyon + en*feksiyon* kelimelerden köken alan bir kelime) olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.33). DNA, kültürdeki hayvan hücreleri içine; hücre çekirdeğine mikroenjeksiyon, DNA'nın kalsiyum fosfat ile oluşturduğu partiküllerin hücre içine alınması, DNA'nın plazma zarı ile kaynaşan lipid vezikülleri (**lipozomlar**)

Şekil 3.33 Hayvan hücrelerine DNA aktarımı
İlgilenilen ökaryot geni, kültürdeki hayvan hücrelerinde seçilimini sağlayacak bir ilaç direnç belirleyicisi içeren plazmid içine klonlanır. Plazmid DNA'sı kültürdeki hücrelerin büyük bir kısmı tarafından alınır ve birkaç gün boyunca eksprese edilir (geçici ekspresyon). Plazmid DNA'sının kromozom DNA'sı içine kalıcı olarak entegre olduğu, kalıcı transforme hücreler, ilaç içeren besi ortamında üreme yetenekleri nedeniyle seçilebilirler.



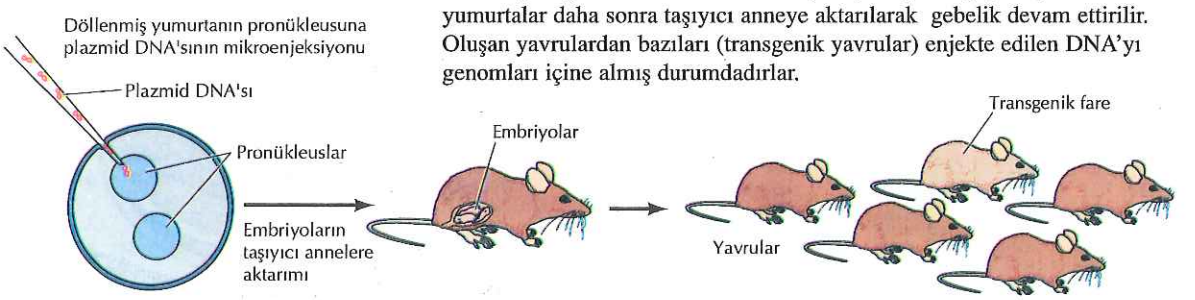


Şekil 3.34 Retroviral vektörler
Retroviral diziler içeren bir vektör, E.coli içinde çoğalabilmesi için bir plazmid içine klonlanır. Yabancı DNA viral diziler arasına yerleştirilir ve rekombinant plazmid bakteriden izole edilir. Hayvan hücre kültürleri bu rekombinant DNA ile transfekte edilir. DNA, eklenen DNA' yı taşıyan rekombinat retrovirusları oluşturacak hücrelerin küçük bir kısmı tarafından alınır. İçinde klonlanmış DNA parçacığını taşıyan viral genom, provirus gibi davranarak, kromozom DNA'sı içine yerleşir. Bu rekombinant retroviruslar yeni hücrelerin etkin bir şekilde enfekte edilmesinde kullanılır.

içinde veya hücrenin plazma zarına kısa elektrik akımı uygulaması ile geçici olarak açılan porlardan (**elektroporasyon**) hücreye sokulmasını içeren, farklı yöntemler kullanılarak aktarılabilir. Hücrelerin büyük bir kısmında DNA'lar çekirdeğe taşınır ve burada birkaç gün boyunca transkribe olur-bu olay **geçiçi ekspresyon** olarak adlandırılır. Hücrelerin küçük bir kısmında ise (%1 ya da daha az) yabancı DNA, hücre genomuna kalıcı olarak bağlanır ve hücre bölünmesi sırasında tıpkı, hücresel diğer genleri gibi, yavru hücrelere aktarılır. Eğer transfekte DNA'lar normal hücrelerin kültürde çoğalmasını engelleyen bir ilaca karşı direnç gibi bir seçici özellik taşıyorsa, kalıcı olarak değişikliğe uğramış olan bu hücreler kültürde elde edilebilirler. Bundan dolayı, klonlanmış herhangi bir gen bir memeli hücresine, kalıcı değişikliğe uğramış hücreleri seçmede kullanılan bir ilaç direnci belirleyicisi ile birlikte aktarılabilir. Klonlanmış bu genin hücre davranışları–örneğin, hücre çoğalması veya farklılaşması gibi- üzerine etkileri bu yolla araştırılabilir.

Hayvan virusları da klonlanmış DNA'ların hücrelere daha etkin olarak aktarılmasında vektör olarak kullanılabilir. Bu alanda retroviruslar, döngüleri viral DNA'nın hücre genomuna kalıcı bağlanmasını gerektirdiği için, özellikle tercih edilmektedir (Şekil 3.34). Sonuçta, retroviral vektörler klonlanmış genlerin farklı hücrelere etkin olarak aktarılmasında kullanılabildiği için, geniş çapta uygulamaların önünü açan önemi taşıyıcı moleküllerdir.

Klonlanmış genler, hücre kültürleri yerine canlı hayvanlarda çalışılmasını olanaklı kılacak şekilde, çok hücreli organizmaların germ hücrelerine de aktarılabilir. Bu gibi yabancı genleri taşıyan fareleri (**transgenik fare**) üretmede kullanılan yöntemlerinden birisi, klonlanmış DNA'nın döllenmiş bir yumurtanın pronükleusu içine doğrudan mikroenjeksiyonudur (Şekil 3.35). Mikroenjeksiyon uygulanan bu yumurtalar taşıyıcı annelere aktarılır ve doğuma kadar beklenir. Yavru farelerin yaklaşık %10 kadarında yabancı DNA, döllenmiş yumurta genomuna kalıcı olarak bağlanır ve böylelikle hayvanın tüm hücrelerinde bu DNA bulunur. Yabancı DNA somatik hücrelerin yanısıra germ hücrelerinde de mevcut olduğu için, bu DNA'yı taşıyan yeni nesillerin döllenme yolu ile oluşması da sağlanır.

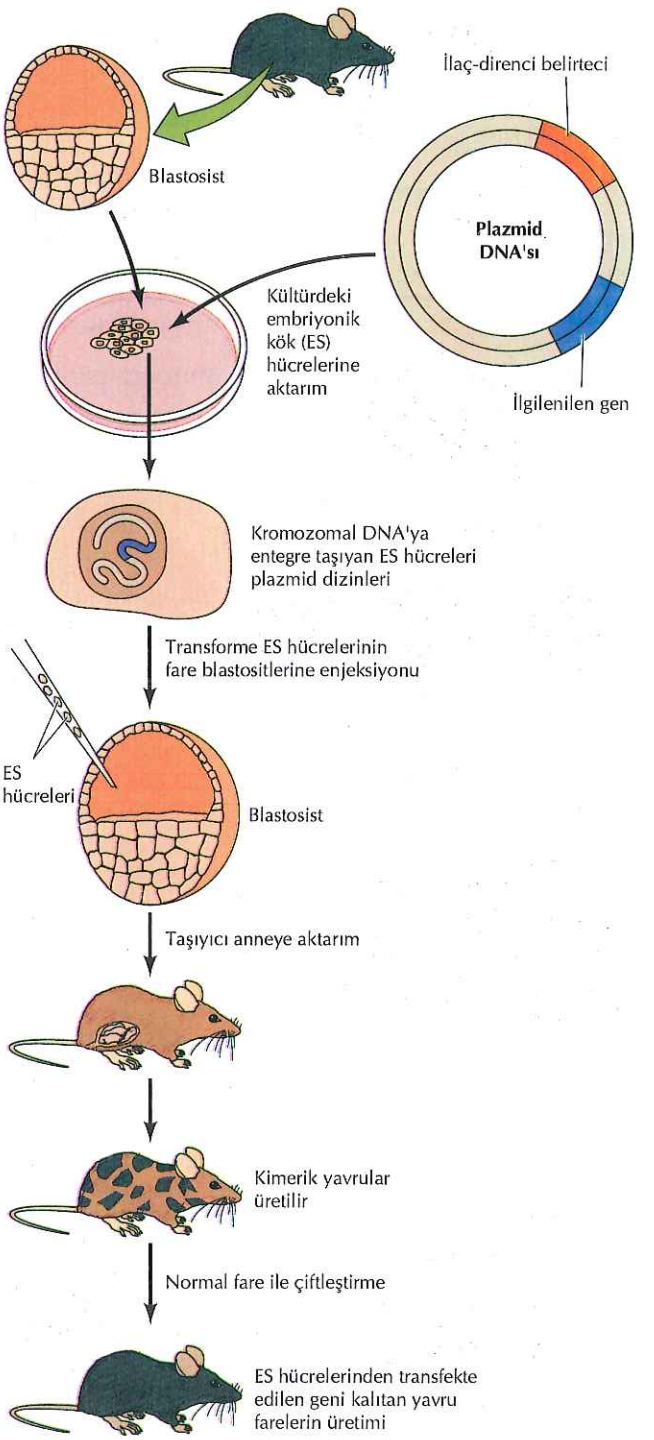


Şekil 3.35 Transgenik fare üretimi
DNA döllenmiş fare yumurtasının pronükleusuna (döllenmiş yumurta, birisi sperm diğeri yumurtadan köken alan iki adet pronükleus taşır) mikroenjeksiyon ile aktarılır. Mikroenjeksiyon işlemi geçirmiş olan yumurtalar daha sonra taşıyıcı anneye aktarılarak gebelik devam ettirilir. Oluşan yavrulardan bazıları (transgenik yavrular) enjekte edilen DNA'yı genomları içine almış durumdadırlar.

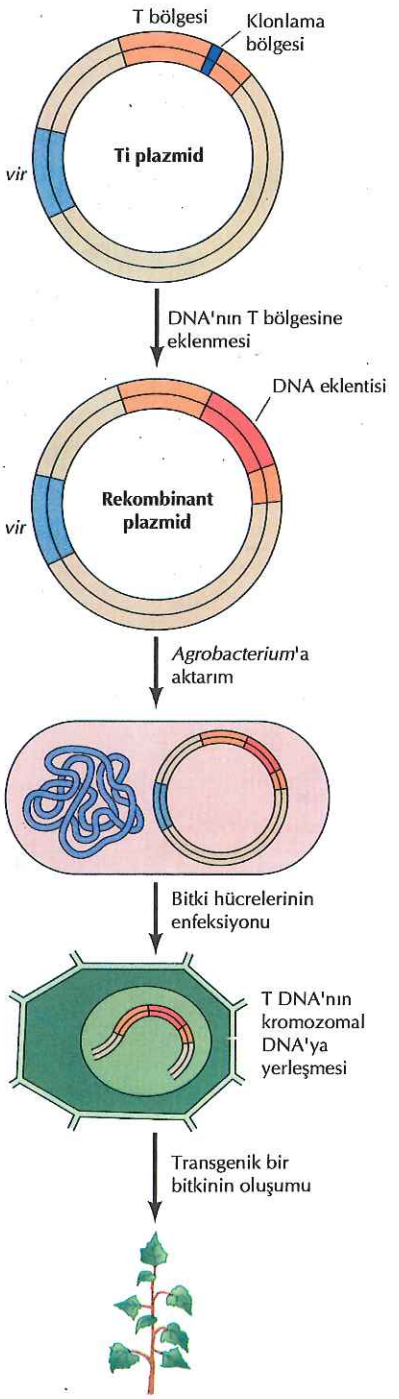
Embriyonik kök hücrelerin (ES) özellikleri, klonlanmış genlerin fareye aktarılmasına farklı bir açılım kazandırmıştır (Şekil 3.36). Erken fare embriyolarından ES hücreleri elde edilerek kültürde üretilebilir. Bu hücreler, normal gelişim aşamalarına devam ederek, germ hücreleri dahil, fare dokularının tüm hücrelerini oluşturmak üzere erken embriyolara yeniden aktarılabilir. Böylece, klonlanmış DNA'nın kültürdeki ES hücreleri içine aktarımı, kalıcı olarak transforme olmuş hücrelerin kültür ortamında seçilmesi ve tekrar fare embriyosuna aktarımı olanaklı hale gelmektedir. Bu tip embriyolar, normal embriyo hücreleri ile bazı transfekte ES hücrelerinden köken alan kimerik döller oluşturur. Bu yapıdaki farelerin bazılarında, transfekte edilmiş ES hücreleri germ hattına katılır. Bu farelerin döllenmesi yoluyla, transfekte genin yeni kuşaklara doğrudan kalıtımı, böylelikle, olanaklı hale gelmektedir.

Klonlanmış DNA'lar bitki hücrelerine de aktarılabilir. Bu işlemde kullanılan yaklaşımlardan biri bitkinin hücre duvarının uzaklaştırılarak sadece plazma zarı ile sarılı protoplazmanın elde edilmesidir. Daha sonra DNA, bu protoplazmanın içine, hayvan hücrelerinde anlatıldığı gibi, elektroporasyon yolu ile aktarılır. Alternatif bir yaklaşım olarak DNA, DNA ile kaplı küçük tungsten parçacıkları gibi, bir mermiyle bombardıman yoluyla, sağlam bitki hücrelerine aktarılabilir. DNA-kaplı partiküller bitki hücrelerine doğrudan vuruş ile aktarılır, bazı hücreler ölürken, yaşamaya devam edenler kalıcı olarak değişikliğe uğratılmış olur.

Rekombinant DNA'nın bitki hücresine daha etkin olarak aktarımı için kullanılan vektörler bitki viruslarından geliştirilmiştir. Buna ek olarak *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinden elde edilen bir plazmid (**Ti plazmid**), farklı bitki türlerine klonlanmış DNA'nın aktarımı için yeni bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 3.37). Doğada, *Agrobacterium*, bitki yapraklarına tutunur ve Ti plazmidi hücre DNA'sına katılmak üzere bitki hücrelerine aktarılır. Ti plazmidinden yapılan



Şekil 3.36. Genlerin embriyonik kök hücreler aracılığı ile farelere aktarımı
Embiryonik kök (ES) hücreler fare embriyosunun erken dönemlerinden (blastosist dönemi) elde edilerek kültürde üretilir. İstenilen klonlanmış DNA parçacığı, kültür ortamındaki bu hücrelere aktarılabilir ve kalıcı transforme ES hücreleri elde edilebilir. Bu transforme ES hücreleri embiryonun normal gelişimine katılmak üzere, alıcı blastosistlere enjekte edilir. Taşıyıcı anneye bu embriyonun transferinden sonra oluşan yavru farelerin bazıları normal blastosist hücrelerini, bazıları ise transforme ES hücrelerinden köken alan hücreleri içerir. Bu fareler iki hücrenin karışımından oluştuğu için kimerik olarak adlandırılırlar. Değiştirilmiş gen taşıyan yavru kuşaklar germ hücrelerinde de transforme olmuş ES hücrelerini taşıyan kimerik farelerin birbirleri ile döllenmesi ile oluşturulabilir.



Şekil 3.37 Genlerin Ti plazmidi aracılığı ile bitki hücrelerine aktarımı
Ti plazmidi, enfekte edilen bitki hücresine aktarılacak olan T bölgesi ve T DNA'nın transferinden sorumlu virulans (*vir*) genini taşımaktadır. Ti plazmid vektörlerinde, yabancı DNA, plazmidin T bölgesine aktarılır. Rekombinant plazmid kültürdeki hücreleri enfekte etmek için kullanılacak olan *Agrobacterium tumefaciens* içine aktarılır. Plazmidin eklenen DNA parçacığını taşıyan T bölgesi bitki hücresine aktarılır ve kromozom DNA'sı içine yerleşir. Daha sonra, bu transforme hücrelerden transgenik bitki oluşturulur.

vektörler, bu nedenle, rekombinant DNA'nın hassas bitki hücrelerine aktarımında etkin bir rol oynamaktadırlar. Pek çok bitki tek bir kültür hücresinden oluşturulabildiği için (bkz. Bölüm 1), transgenik bitkiler, rekombinant DNA içeren kültür hücrelerinden -transgenik hayvan üretiminden çok daha kolay bir işlemle- doğrudan elde edilebilirler.

Klonlanmış DNA'larda Mutasyon Oluşturma

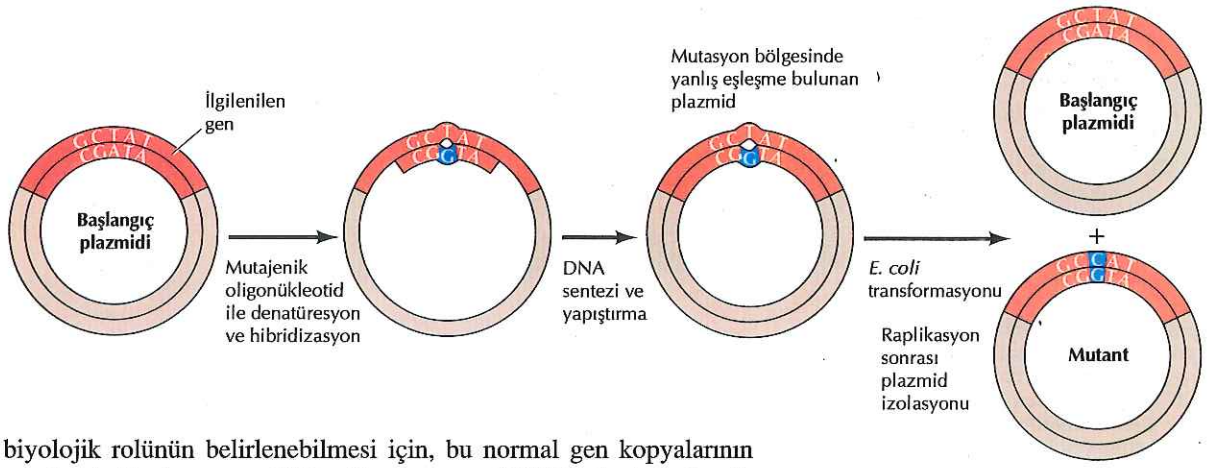
Klasik genetik çalışmalarda (örn., bakteri ve mayalarda yapılan) mutantlar, mutant organizmalardaki değişmiş fenotiplerin incelenmesi ile genleri saptamak ve işlevlerini araştırma yönünden büyük öneme sahiptir. Bu tip çalışmalarda, mutant genler sıcaklığa duyarlı veya özel beslenme koşulu gerektirme gibi, gözlenebilir fenotipik değişikliklere sahip oldukları için kolaylıkla saptanabilirler. Genlerin rekombinant DNA ile belirlenmesi, mutasyon oluşturma (mutagenez) çalışmalarına farklı bir yaklaşım getirmiştir. Bugün, klonlanmış herhangi bir gende, isteğe bağlı mutasyon oluşturmak ve bunun fonksiyon üzerindeki etkilerini saptamak olanaklıdır. Bu işlemler, önce, gende mutasyon oluşturulması ve ortaya çıkan fonksiyon değişikliklerinin sonra saptanması nedeniyle **ters genetik** olarak adlandırılır. Klonlanmış DNA içinde özgün mutasyon oluşturulması (***in vitro* mutagenez**) ökaryot genlerinde ekspresyon ve fonksiyon çalışmaları için güçlü bir teknik olduğunu kanıtlamıştır.

Klonlanmış genlerde *in vitro* mutagenez işlemi kullanılarak, delesyon, insersiyon veya tek baz değişikliği yaratma gibi, pek çok değişiklik oluşturulabilir. Nükleotidlerde değişiklik oluşturmak için sentetik oligonükleotidlerden yararlanma, yaygın olarak kullanılan bir mutagenez yöntemidir (Şekil 3.38). Bu işlemde mutant baz bulunduran sentetik bir oligonükleotid DNA sentezinde primer olarak kullanılır. Yeni sentezlenen ve mutasyon içeren DNA molekülü, daha sonra, izole edilerek nitelendirilir. Örneğin, protein işlevindeki görevini belirlemek için, bir proteindeki özgün bir amino asit değiştirilebilir.

Bu uygulamanın, rekombinant DNA molekülü üzerinde değişiklik yapmaya yarayan diğer yöntemler ile birlikte kullanılan farklı varyasyonları, klonlanmış bir gende istenen herhangi bir değişikliği yapabilmeyi olanaklı kılmaktadır. Bu mutasyonların, gen ekspresyonu ve fonksiyonu üzerinde etkisi, genin uygun tipte bir hücre içine aktarılması ile belirlenebilir. Böylelikle *in vitro* mutagenez, klonlanmış genlerin düzenleyici ve protein kodlayan dizinlerinin, işlevsel rollerinin ayrıntılı olarak belirlenmesine olanak sağlar.

Hücresel Genlerde Mutasyon Oluşturma

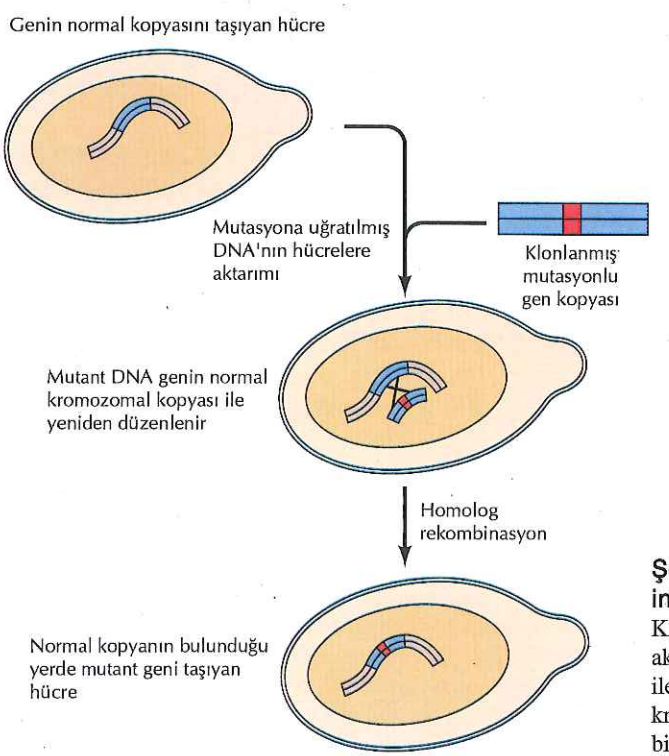
Klonlanmış bir genin hücreler içine aktarımı (özellikle *in vitro* mutagenez ile birlikte), gen yapısı ve işlevini çalışmayı olanaklı kılan güçlü bir yaklaşım olsa da, bir hücre ya da bütünlüğü bozulmamış bir organizmadaki bilinmeyen bir genin işlevinin ne olduğunun anlaşılması için yeterli değildir. Klonlanmış genlerin aktarımında alıcı hücreler, kromozomal DNA'larında genin normal ve işlevsel kopyalarına sahip olan hücrelerdir. Bu nedenle, klonlanmış bir genin



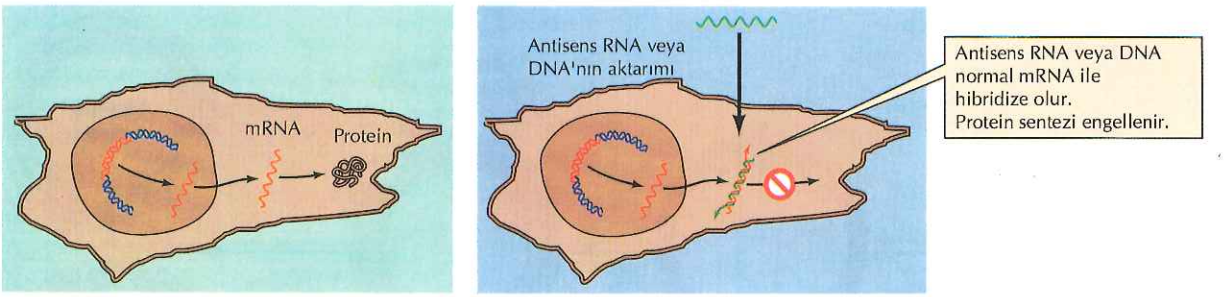
Şekil 3.38 Sentetik oligonükleotidler ile mutagenez
İstenilen baz değişikliğini taşıyan oligonükleotid, plazmid DNA'sında DNA sentezini başlatmak için kullanılır ve DNA ligaz ile DNA çembersel hale getirilir. Bu işlem sonucunda elde edilen plazmid, bir ipliğinde normal, diğer ipliğinde ise mutant bazı taşır. *E.coli*'ye transformasyon sonrasında plazmid DNA replikasyonu ile hem başlangıç, hem de mutant plazmidlerin bir karışımı elde edilir.

biyolojik rolünün belirlenebilmesi için, bu normal gen kopyalarının ortadan kaldırılması gereklidir. Bundan sonraki bölümde tartışılacağı gibi, bu işlem mayalarda kolaylıkla başarılabilir. Hayvan hücrelerinde ise, kromozomal kopyaların klonlanmış gen tarafından inaktivasyonu ya da fonksiyonlarının durdurulması gibi birçok farklı uygulamalar yaygın olarak kullanılsa da, bu işlem çok daha zordur.

Mayalarda kromozom genlerinin mutasyona uğratılması, mayaya aktarılan DNA'nın mayanın kromozom kopyaları ile sıklıkla **homolog rekombinasyon** yapması nedeniyle, göreli olarak daha kolaydır (Şekil 3.39). Homolog rekombinasyonda, klonlanmış maya geni normal allelin yerine geçer, böylelikle klonlanmış gende oluşturulan mutasyon maya geninin kromozom kopyası ile *in vitro* ortamda birleştirilmiş olur. Genlerin hücresel işlevlerdeki rollerini anlamak için en basit uygulama, normal gen kopyasının yerine, klonlanmış geni etkisizleştiren mutasyonların aktarılmasıdır. Mayalar, yaşam döngülerinde hem haploid hem de diploid yapı içerdikleri için, hücre



Şekil 3.39 Homolog rekombinasyon ile gen inaktivasyonu
Klonlanan genin mutasyona uğratılmış kopyası hücreye aktarılır.Klonlanmış gen homolog rekombinasyon yolu ile normal gen kopyasının yerini alabilir ve böylece kromozom DNA'sı içinde istenilen mutasyonu taşıyan bir hücre elde edilir.



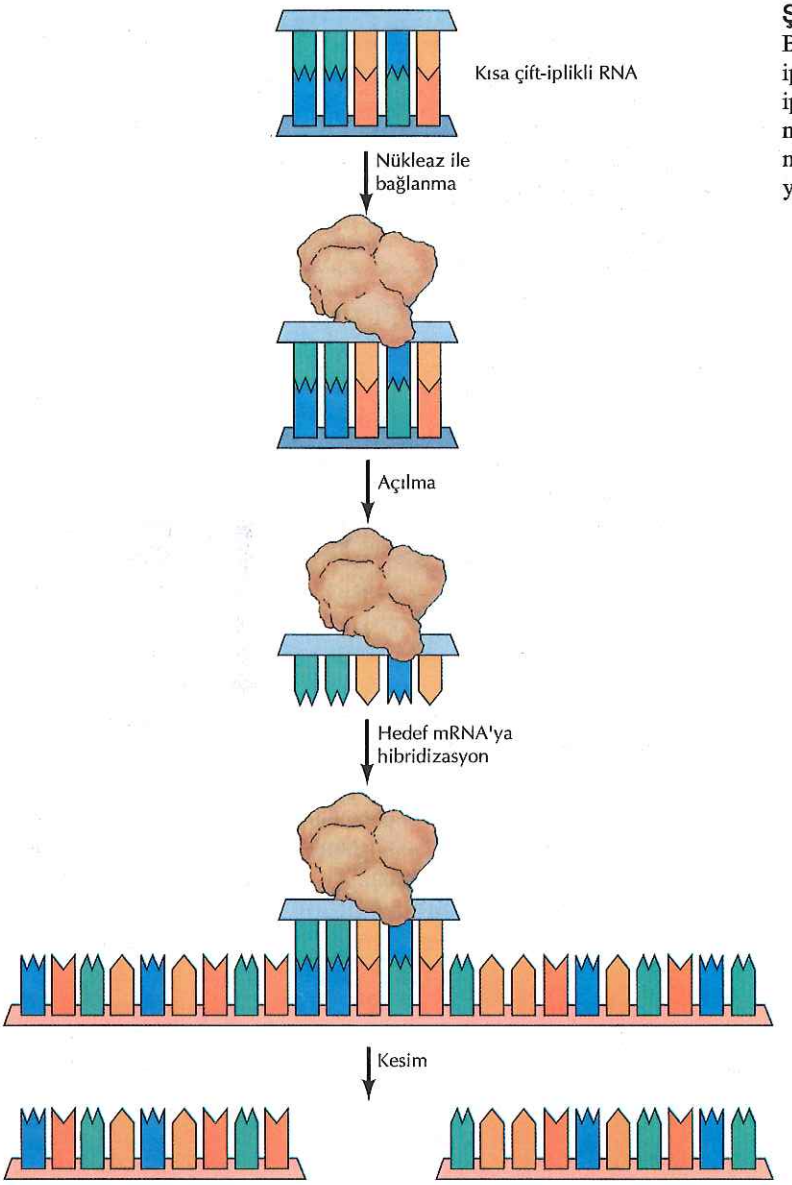
Şekil 3.40 Gen ekspresyonunun antisens RNA veya DNA ile baskılanması
Antisens RNA veya tek iplikli DNA, hedeflenen genin mRNA dizisine tamamlayıcıdır. Antisens nükleik asitler böylece hedef mRNA' ları ile hibrid oluşturur ve mRNA'dan protein sentezini durdurur ve mRNA yıkımına yol açar.

çoğalmasında rol alan genler bile inaktive edilebilir ve çalışılabilir. Bu işlemde inaktif gen kopyası diploid hücre içine aktarılır, diploid hücreler böylelikle hedef gene ait bir işlevsel ve bir de aktif olmayan kopya taşır. Hücreler mayoza girmek için uyarılır ve gen aktivitesinin engellenmesinin haploid yapıdaki yavru hücrelere etkisi gözlenebilir.

Hücreye aktarılan DNA ile, buna homolog kromozom geni arasındaki rekombinasyon, memeli hücrelerinde nadir olarak gözlenen bir olaydır. Bu nedenle, gen aktivitesinin engellenmesi yaklaşımının memeli hücresinde uygulanması, mayalardan daha zordur. Memeli genomun maya genomundan çok daha büyük olması nedeniyle, transfekte DNA'nın, alıcı hücre genomundaki ilintisiz dizinler ile gelişigüzel rekombinasyon yapma olasılığı yüksektir. Bununla birlikte, memeli hücrelerindeki genlerin inaktivasyonu için, hem homolog rekombinasyon oranının artırılması, hem de homolog rekombinasyonu taşıyan hücrelerin seçilmesi ve eldesi için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. Önemli bir nokta da, gen aktivasyonlarının, sadece somatik hücre hatlarında değil, aynı zamanda kültürde üretilen embriyonik kök hücrelerde de engellenebileceği gerçeğidir. Daha önce söz edildiği gibi ES hücreler, genetik yapısı değiştirilmiş farelerin oluşturulmasında kullanılabilmekte ve bu yolla bir genin aktivitesinin engellenmesinin etkileri, canlı hayvan üzerinde, incelenebilmektedir. Yüzlerce fare geninin fonksiyonu bu yöntemle araştırılmaktadır ve bu çalışmalar, fare gelişim sürecine katılan özgün genlerin rollerinin ortaya çıkarılmasında özel öneme sahiptir.

Gen aktivitesinin homolog rekombinasyon yoluyla engellenmesine alternatif olan bir yaklaşım da, gen ekspresyonunun **antisens nükleik asitler** ile durdurulmasıdır (Şekil 3.40). Bu yöntemde, hedef genin mRNA dizisine eşlenik RNA veya tek iplikli DNA (antisens) hücre içine aktarılır. Bu antisens RNA ya da DNA, eşleniği mRNA ile bihibridize olur ve mRNA'nın proteine çevrimini engeller. Daha da önemlisi, antisens DNA moleküllerinin hücreye aktarımı ile oluşan RNA-DNA hibridleri hücre içinde yıkıma uğramaktadır. Antisens RNA'lar hücreye doğrudan mikroenjeksiyon yöntemi ile aktarılabilir. Bunun dışında, hücreler antisens RNA eksprese etmek üzere tasarlanmış vektörler ile transfekte edilebilirler. Antisens DNA ise genellikle mikroenjeksiyon yolu ile hücreye aktarılan, kısa oligonükleotidlerdir (yaklaşık 20 baz uzunluğunda). Hücreler kültür ortamındaki oligonükleotidleri içeri alabildikleri için, antisens oligonükleotidler doğrudan kültür ortamına da eklenebilir.

Gen ekspresyonunu mRNA düzeyinde durdurmak için diğer etkin bir yöntem, **RNA interferens (RNAi)** dir (Şekil 3.41). Bu yöntemde, kısa, çift iplikli RNA molekülleri (21-23 baz uzunluğunda) eşlenik RNA'ların yıkılmasını uyarır. Kısa, çift iplikli RNA'ların hedef

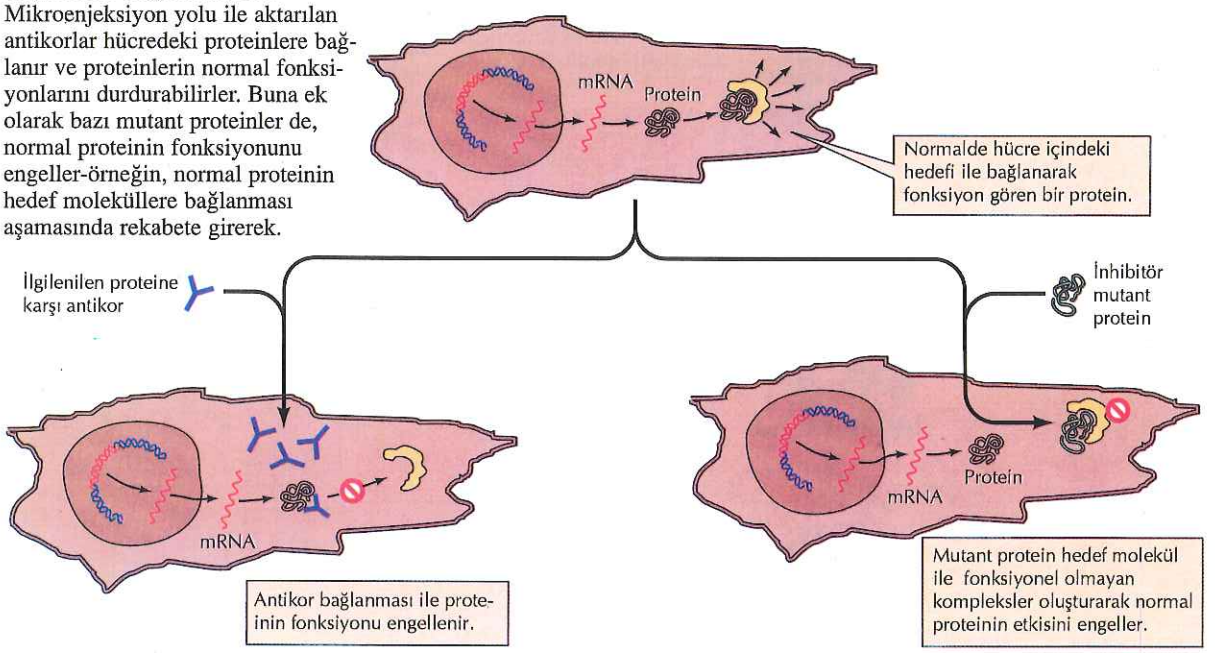


Şekil 3.41 RNA interferens
Bir protein ribonükleaz ile bağlanan çift iplikli kısa RNA molekülleridir. Çift iplikli RNA sarmalı açılıp, homolog bir mRNA ile birleştiği zaman, nükleaz mRNA'yı hedefler ve mRNA yıkımına yol açar.

mRNA'ları yıkıma uğratmasının mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, çift iplikli RNA'ya bağlanan bir ribonükleazın, tamamlayıcı baz eşleşmesi yolu ile hedef mRNA'ya yönlendirildiği anlaşılmaktadır. RNAi'nin etkin olarak mRNA yıkımını uyardığı, ilk olarak, *C.elegans*'ta bulunmuş olup, kullanımı daha sonra *Drosophila, Arabidopsis* ve en son olarak da memeli hücrelerine genişletilmiştir.

Gen aktivasyonunun engellenmesi ya da mRNA'nın yıkıma uğratılması çalışmalarına ek olarak, bazen, hücre içi proteinlerin işlevinin engellenmesi de olanaklıdır (Şekil 3.42). Bir uygulama, antikorların mikroenjeksiyonu ile, bu antikorun tanıdığı proteinin aktivitesinin engllenmesidir. Alternatif olarak, bazı mutant proteinler aynı hücre içinde eksprese edildikleri zaman, normal proteinlerin işlevlerini engelleyebilirler – örneğin mutant ve normal proteinlerin

Şekil 3.42 Protein işlevinin doğrudan engellenmesi
Mikroenjeksiyon yolu ile aktarılan antikorlar hücredeki proteinlere bağlanır ve proteinlerin normal fonksiyonlarını durdurabilirler. Buna ek olarak bazı mutant proteinler de, normal proteinin fonksiyonunu engeller-örneğin, normal proteinin hedef moleküllere bağlanması aşamasında rekabete girerek.



aynı hedef moleküle bağlanmak için yarışmaları gibi. Bu gibi mutant proteinleri kodlayan DNA klonları (**dominant inhibitör mutantlar** olarak adlandırılır) gen transferi yolu ile hücreye aktarılabilir ve normal gen işlevini durdurabilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

gen, allel, baskın, çekinik, genotip, fenotip, kromozom, diploid, mayoz, haploid, mutasyon

bir gen-bir enzim hipotezi

transformasyon

yarı korunumlu replikasyon
DNA polimeraz

ÖZET

KALITIM, GENLER, VE DNA

Genler ve Kromozomlar: Kromozomlar genlerin taşıyıcısıdır.

Genler ve Enzimler: Bir polipeptit zincirinin nükleik asit dizisini bir gen belirler.

DNA'nın Genetik Materyal Olarak Tanımlanması: DNA'nın genetik materyal olduğu bakteri transformasyonu deneyleri ile anlaşılmıştır.

DNA'nın Yapısı: DNA karşılıklı ipliklere yerleşik pürin ve pirimidinler arasındaki hidrojen bağları ile birbirine tutunmuş, bir çift sarmaldır. A ile T ve G ile C bazları arasındaki özgün baz eşleşmeleriyle iki zincir birbirini tamamlar.

DNA'nın Replikasyonu: DNA, yarı korunumlu replikasyon ile kendini eşler, bunun için iki ipliği birbirinden ayrılır ve her iki iplik de yeni yavru ipliklerin sentezlenmesi için kalıp olarak iş görür.

GENETİK BİLGİNİN EKSPRESYONU

Genler ile Proteinler Arasındaki Doğrudan İlişki: DNA'daki nükleotidlerinin sıralanma düzeni, proteinleri oluşturan amino asitlerin sırasını belirler.

Mesajcı RNA'nın Rolü: Mesajcı RNA, protein sentezi için kalıp görevini görerek DNA'daki bilginin ribozomlara iletilmesinde aracı olarak fonksiyonu görür.

ana dogma, transkripsiyon, proteine çevrim, mesajcı RNA (mRNA), RNA polimaraz, ribozomal RNA (rRNA), taşıyıcı RNA (tRNA)

Genetik Kod: Taşıyıcı RNA'lar translasyon sırasında amino asitler ile mRNA'lar arasında adaptör rolünü üstlenir. Her bir amino asit üç nükleotidten oluşan kodonlar tarafından belirlenir.

genetik kod, in vitro translasyon, kodon

RNA Virusları ve Ters Transkripsiyon: DNA, ilk kez retroviruslarda saptandığı gibi, RNA kalıbından sentezlenebilir.

retrovirus, ters transkripsiyon, revers transkriptaz

REKOMBİNANT DNA

Restriksiyon Endonükleazlar: Restriksiyon endonükleazlar, DNA molekülünü özgün DNA dizilerden tanıyıp, parçacıklar elde edilecek şekilde keserler.

restriksiyon endonükleaz, jel elektroforezi, kesim bölgesi haritası

Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması: Rekombinant DNA molekülleri, uygun konakçı hücre içinde bağımsız olarak replike olabilen bir vektöre bağlanmış, özgün bir DNA parçacığı içerir.

moleküler klonlama, vektör, rekombinant molekül, moleküler klon, DNA ligaz, cDNA

Rekombinant DNA Vektörleri: Farklı büyüklükteki DNA parçalarının klonlanmasında birçok farklı vektör kullanılır.

plazmid, replikasyon orijini, kozmid, P1 yapay kromozom (PAC), bakteri yapay kromozomu (BAC), maya yapay kromozomu (YAC)

DNA Dizi Analizi: Klonlanmış DNA parçacıklarının nükleotid dizileri belirlenebilir.

dideoksinükleotid, otoradyografi

Klonlanmış Genlerin Ekspresyonu: Klonlanmış genler tarafından kodlanan proteinler bakteri veya ökaryot hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilebilir.

ekspresyon vektörleri, bakulovirus

DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Amplifikasyonu: PCR, DNA'nın özgül bölümlerinin *in vitro* izolasyonunu ve amplifikasyonunu sağlar.

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

NÜKLEİK ASİT VE PROTEİNLERİN SAPTANMASI

Nükleik Asit Hibridizasyonu: Nükleik asit hibridizasyonu özgün DNA ve RNA dizinlerinin saptanmasını sağlar.

nükleik asid hibridizasyonu, prob, Southern blotlama, Northern blotlama, DNA mikrodizin, *in situ* hibridizasyon

Küçük Miktarlarda DNA veya RNA'nın PCR ile Belirlenmesi: PCR küçük miktarlarda özgün DNA ya da RNA parçalarının saptanması için duyarlı bir yöntem sunar.

Protein Probu Olarak Antikorlar: Antikorlar, hücrelerde veya hücre ekstrelerindeki özgün proteinlerin saptanmasında kullanılırlar.

antikor, antijen, monoklonal antikor, immunblotlama, Western blotlama, immün çöktürme, SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Rekombinant DNA Kütüphanelerini Taramada Kullanılan Problar: Rekombinant DNA kütüphaneleri içindeki özgün DNA parçaları, ya nükleik asit hibridizasyonu ya da antikor problar kullanılarak saptanabilir.

rekombinant DNA kütüphanesi, genomik kütüphane, cDNA kütüphanesi

sıcaklığa-duyarlı mutant

gen aktarımı, transfeksiyon, geçici ekspresyon, lipozom, elektroporasyon, transgenik fare, embriyonik kök hücre (ES), Ti plazmid

ters genetik, *in vitro* mutagenez

homolog rekombinasyon, antisens nükleik asit, RNA interferans (RNA), dominant inhibitör mutant

ÖKARYOTLARDA GEN FONKSİYONU

Mayalarda Genetik Analiz: Mayanın basit genetiği ve hızlı replikasyon yeteneği, herhangi bir maya mutasyonuna karşılık gelen bir genin moleküler olarak klonlanmasını kolaylaştırır.

Bitki ve Hayvanlarda Gen Aktarımı: Klonlanmış genler fonksiyon analizleri için karmaşık yapıdaki ökaryot hücrelerine ve çok hücreli organizmalara aktarılabilir.

Klonlanmış DNA'larda Mutagenez: Klonlanmış DNA'larda in vitro mutagenez, amaca yönelik olarak oluşturulan mutasyonların gen fonksiyonu üzerindeki etkilerinin çalışılmasında kullanılır.

Hücresel Genlerde Mutasyon Oluşturma: Kromozomal gen kopyalarında, klonlanmış DNA dizileri ile homolog rekombinasyon yoluyla mutasyon oluşturulur. Ayrıca, belirli genin ürün vermesi, antisens nükleik asitlerle, RNA interferans ile veya dominant inhibitör mutantlar ile engellenebilir.

Sorular

1. Moleküler biyoloji kavramı içinde çeviriyi tanımlayın?

2. *in vitro* protein sentezinin gerçekleşmesi için gerekli olan bileşenler nelerdir?

3. Bir amino asit kodonunun ilk keşfi nasıl gerçekleşmiştir?

4. Genetik kodun gevşek olması ne demektir?

5. Bir genin kodlayan bölgesinde bir ya da iki nükleotidin eklenmesi veya kaybı fonksiyon göremeyen bir protein üretirken, üç nükleotidin birden eksilmesi ya da eklenmesi, sıklıkla hemen hemen normal fonksiyon gören bir protein üretir. Açıklayın.

6. *Eco*RI ile kesilmiş insan DNA parçasının mayada klonlanabilmesi için, maya yapay kromozomunda bulunması gereken özellikleri tanımlayınız.

7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) neden bu kadar yararlıdır?

8. Genomik kütüphane ve cDNA kütüphanesi arasında ne fark vardır?

9. Aktif bölgesinde UGU üçlüsü tarafından kodlanan sistein amino asidi içeren bir enzim ile çalışıyorsunuz. Üçüncü bazın C'ye dönüşmesi enzim fonksiyonunu nasıl etkiler? A'ya dönüştüren bir mutasyon oluşursa ne olur?

10. Bir 4-kb'lık DNA molekülü *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde, 1kb ve 3kb uzunluğunda iki parçaya ayrılır. Aynı molekülün *Hind*III ile kesilmesi ise 1.5kb ve 2.5kb uzunluğunda parçalar verilir. Son olarak, EcoRI ve *Hind*III'nin her ikisinin birden kullanılmasında ise 0.5kb, 1kb ve 2.5kb büyüklüğünde parçalar elde edilir. *Eco*RI ve *Hind*III kesim bölgelerinin pozisyonlarını gösteren bir kesim bölgesi haritası çiziniz.

11. Tek bir spermden elde edilen DNA ile başladığımızda 10 PCR döngüsü sonunda özgün bir genden kaç kopya elde edilebilir? 30 döngü sonunda ne olur?

12. Fonksiyonu bilinmeyen bir cDNA'yı klonladınız. Bu genin kodla-dığı proteinin hücre içindeki yerleşi-mini deneysel olarak nasıl belirlersiniz?

13. Bir enzimin katalitik aktivitesinde önemli olan amino asitleri belirlemekle ilgileniyorsunuz. cDNA klonunun mevcut olduğunu var saydığınızda, hangi deneysel yaklaşımları kullanabilirsiniz?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Genel

Lewin, B. 2000. *Genes* VII. Oxford: Oxford Univ. Press.

Weaver, R. F. 2002. *Molecular Biology.* 2nd ed. New York: McGraw-Hill.

Kalıtım, Genler ve DNA

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79:137-158. [P]

Franklin, R. E. and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucieate. *Nature* 171: 740-74]. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131:1503-1508. [P]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA44: 671-682. [P]

Watson, J.D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964-967. [P]

Watson, J.D. and R H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171:738-740.[P]

Genetik Bilginin Ekspresyonu

Baltimore, D. 1970. RNA-depcndent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211. [P]

Brenner, S., E Jacob and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576-581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and R. J. Watts-Tobin. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232. [P]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326-328. [P]

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399-1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonudeotides. *Proc. Nail. Acad. Sci.* USA47:1588-1602.[P]

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213. [P]

Yanofsky, C., B. C. Cariton, J. R. Guest, D. R. Helinski and U. Henning. 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 51: 266-272. [P]

Rekombinant DNA

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: Greene Publishing and Wiley mterscience. [R]

Burke, D. T, G. P. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast bv means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Bov er and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244. [P]

Nathans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273-293. [R]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Muiiis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. [P]

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. Molecular *Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 74: 5463-5467. [P]

Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Saptanması

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.

Benton, W. D. and R. W. Davis. 1977. Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ. Science* 196: 180-182. [P]

Broome, S. and W. Gilbert. 1978. Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA75:2746-2749. [P]

Brown, P. O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 21: 33-37. [R]

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230:281-285. [R]

Gerhold, D., T. Rushmore and C. T. Caskey. 1999. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci.* 24:168-173. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 72: 3961-3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1999. *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497. [P]

Maniatis, T, R. C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, G. K. Sim and A. Efstratiadis. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15:687-701. [P]

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. Molecular *Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schildkraut, C. L., J. Marmur and P. Doty. 1961. The formation of hybrid DNA molecules, and their use in studies of DNA homologies. *J. Mol. Biol.* 3: 595-617. [P]

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517. [P]

Ökaryot Gen Fonksiyonları

Botstein, D. and D. Shortle. 1985. Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis. *Science* 229:1193-1201. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155-27158. [R]

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292. [R]

Gasser, C. S. and R. T. Fraley. 1989. Genetically engineering plants tor crop improvement. *Science* 244:1293-1299. [R]

Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddie. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 77: 7380-7384. [P]

Herskowitz, 1.1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329:219-222. [R]

Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 117: 1229-1231. [P]

Hutvagner, G. and P. D. Zamore. 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 225-232. [R]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007-1015. [R]

Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474. [R]

Joyner, A. L., ed. 1993. *Gene Targchng. A Practical Approach.* Oxford, England: IRL Press.

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewskv. 1995. Tnducible gene targeting in mice. *Science* 269:1427-1429. [P]

Maliga, P, D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner, eds. 1994. *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germ line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465-499. [R]

Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn and M. Evans. 1986. Germline transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-448. [P]

Sedivy, J. M. 1999. Gene targeting and somatic cell genetics: A rebirth or a coming of age? *Trende Genet.* 15: 88-90. [R]

Sharp, P. A. 2001. RNA interference—2001. *Genes Dev.* 15: 485-490. [R]

Smith, M. 1985. in vitro mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423-462. [R]

Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305:391-397. [R]

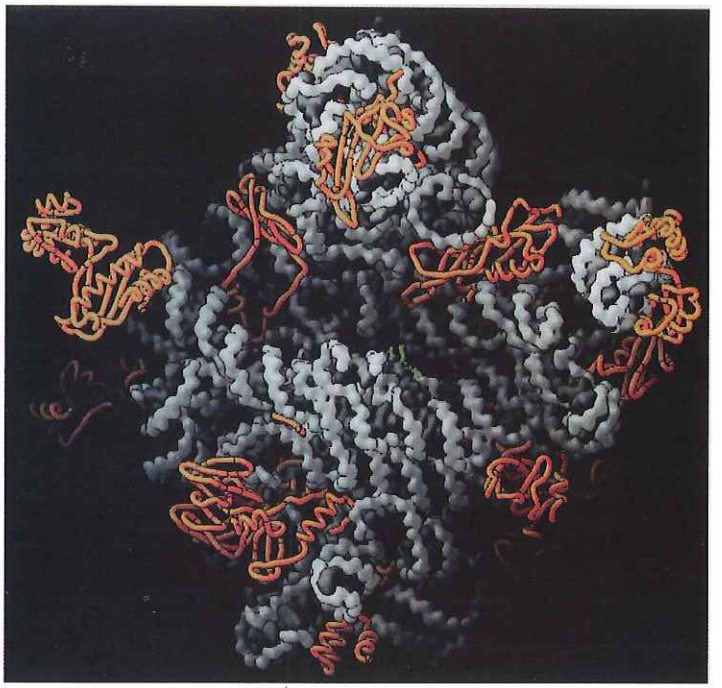
Thomas, K. R. and M. R. Capecchi, 1987. Sitedirected mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-512. [P]

Wagner, R. W. 1994. Gene inhibition using antisense oligonudeotides. *Nature* 372: 333-335. [R]

Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel. 1979. Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. *Cell* 16: 777-785. [P]

Kısım II

Genetik Bilgi Akışı



4 *Hücresel Genomların Organizasyonu ve Dizilimleri*

5 *Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi*

6 *RNA Sentezi ve İşlenmesi*

7 *Protein Sentezi, İşlenmesi ve Regülasyonu*

Bölüm 4

Hücresel Genomların Organizasyonu ve Dizilimleri

Ökaryot Genomlarının Karmaşıklığı 139

Kromozomlar ve Kromatin 150

Tam Genom Dizileri 158

ANAHTAR DENEY: İntronların Bulunması 142

ANAHTAR DENEY: İnsan Genomu 170

GENETİK MATERYAL OLARAK DNA, tüm hücresel aktiviteleri yöneten ve çok hücreli organizmalarda gelişimsel planı belirleyen bir taslak oluşturur. Bu nedenle gen yapısı ve işlevinin anlaşılması hücrelerin moleküler biyolojisinin anlaşılması için temel şarttır. Gen klonlamanın gelişimi bilim adamlarına karmaşık ökaryotik genomları parçalarına ayırmak ve ökaryotik genlerin işlevlerini incelemek imkanını tanıyarak, bu yolda büyük bir adım atılmasını sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisinin giderek gelişmesi, artık, bizi tam genom dizilerinin belirlenmesi gibi heyecan verici bir noktaya getirmiş ve hücre davranışlarının genetik temelinin açıklanmasına yeni bir yaklaşım sağlamıştır.

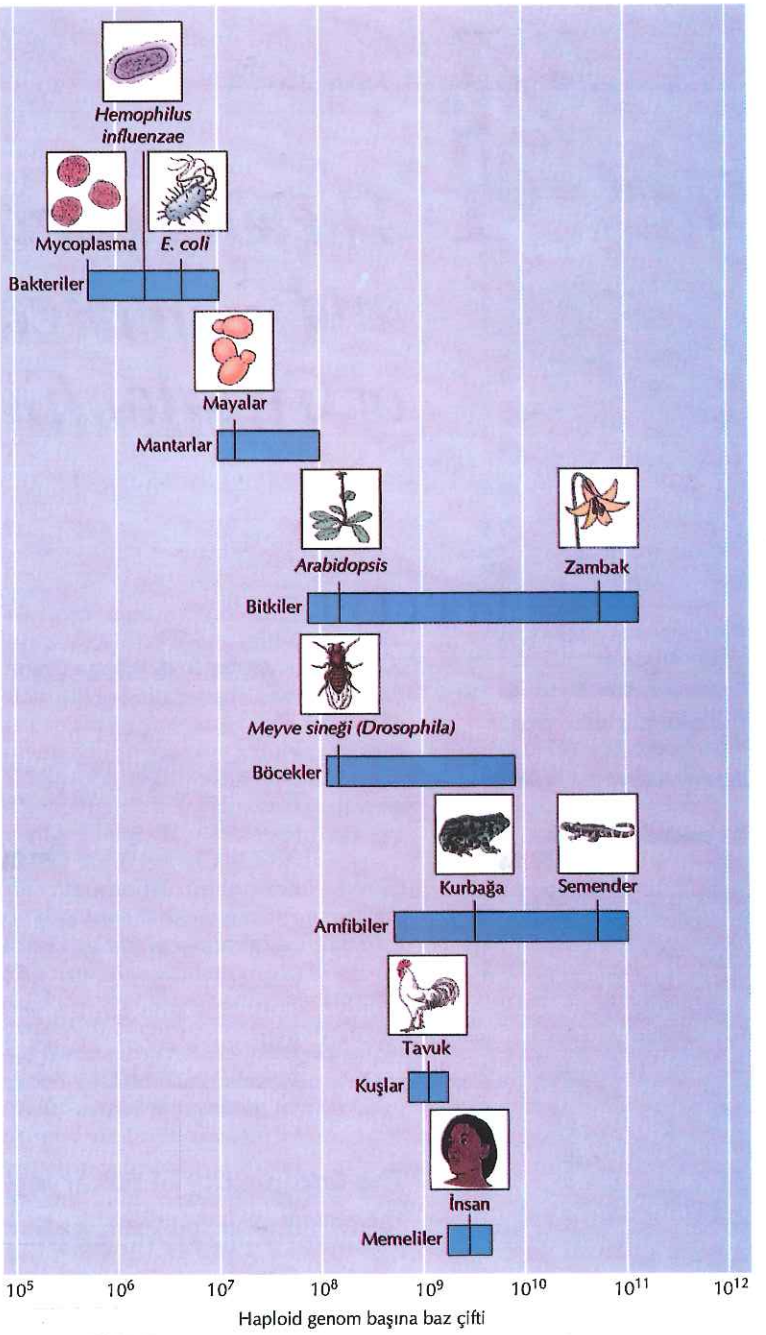
Bölüm 3'de gözden geçirildiği şekilde, rekombinant DNA'nın ilk kullanım alanları, tek tek genlerin izolasyonu ve analizine yönelikti. Son birkaç yıl içinde ise tüm genomu dizileme şeklinde, daha global bir yaklaşımla birçok bakterinin, mayanın ve insanlar dahil birkaç bitki ve hayvan türünün tam genom dizisini ortaya çıkarmıştır. Bu, tam hücresel genomların dizileri, daha önceden bilinmeyen birçok genin tanımlanması dahil çok zengin bir bilgi kaynağı olmuştur. Genom dizileme projelerinin sonuçlarının, moleküler ve hücresel biyolojide gelecekte birçok yıl boyunca araştırmaları stimule etmesi ve insan hastalıklarını anlamamız ve tedavileri üzerine çok büyük bir etkisi olması beklenebilir.

Ökaryot Genomlarının Karmaşıklığı

Çoğu ökaryotun genomu prokaryotların genomundan daha büyük ve daha karmaşıktır (Şekil 4.1). Ökaryot genomların büyüklüğünün daha fazla olması çok şaşırtıcı değildir, çünkü daha karmaşık organizmalarda daha fazla gen bulmayı bekleriz. Ancak ökaryotların genom büyüklüğü genetik karmaşıklıkla ilişkili değil gibidir. Örneğin, semenderler ve zambak genomlarında insan genomundakinin 10 katından daha fazla miktarda DNA bulunmasına karşın, bu organizmaların insanlardan daha karmaşık olmadığı açıktır.

Bir paradoks gibi görünen bu durum, çoğu ökaryotik hücrenin genomunun sadece işlevsel genler değil aynı zamanda büyük miktarda protein kodlamayan DNA dizisi de kapsadığının gösterilmesiyle

Sekil 4.1 Genom büyüklüğü
Temsili organizma gruplarının genomlarının büyüklükleri logaritmik ölçekte gösterilmiştir.



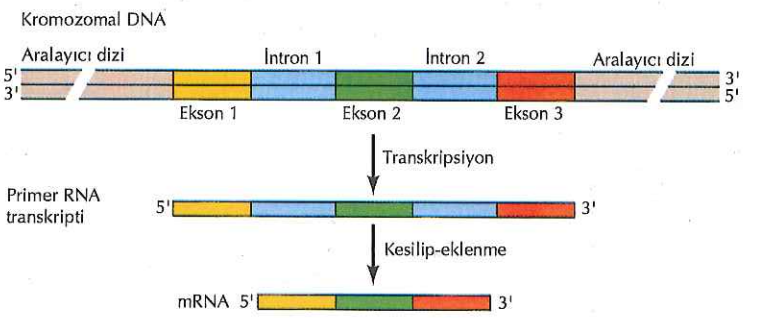
çözümlendi. Böylece semenderler ve insan genomlarının büyüklüklerindeki fark, semenderin genomunda daha fazla gen değil daha fazla miktarda kodlamayan DNA bulunmasını yansıtmaktadır. Büyük miktarda kodlamayan dizi varlığı karmaşık ökaryotların genomlarının genel bir özelliğidir. Böylece, insan genomunun *E. coli*'ye göre bin kat daha büyük olması sadece daha fazla sayıda insan geni bulunmasına bağlı değildir. İnsan genomunun 30,000-40,000 gen kapsadığı düşünülmektedir ve bu sayı *E.coli*'deki miktarın sadece 10 katıdır. Böylece ökaryotik genomlardaki karmaşıklığın büyük kısmı, yüksek ökaryot hücrelerde DNA'nın çoğunluğunu oluşturan birkaç değişik tipte kodlamayan dizinin, çok miktarda bulunmasından kaynaklanmaktadır.

İntronlar ve Eksonlar

Moleküler olarak bir **gen**, bir RNA (örn., ribozomal veya transfer RNA) veya bir polipeptid olabilen işlevsel bir ürün oluşturacak şekilde eksprese olan bir DNA bölgesi olarak tanımlanabilir. Ökaryotlardaki kodlamayan DNA'nın bir kısmı, genler arasındaki uzun DNA dizileridir (**aralayıcı diziler**). Ökaryot genlerinin içinde de, büyük miktarda kodlamayan DNA bulunur. Bu tip genlerin kodlayan dizi bölgelerinin (**eksonlar** adı verilir) kodlamayan dizilerden (aradaki diziler veya **intronlar**) ayrıldığı bölünmüş bir yapısı vardır (Şekil 4.2). Tüm genin uzun bir RNA molekülü oluşturacak şekilde transkripsiyonu yapılır, intronlar daha sonra kesilerek ayrılır ve böylece mRNA'da sadece eksonlar bulunur. Çoğu intronun bilinen bir işlevi olmasa da, yüksek ökaryotların genomundaki DNA'nın büyük bir kısmını oluştururlar.

Intronlar ilk kez 1977'de, insan hücre kültürlerinde adenovirus replikasyonunun incelendiği çalışmalarda, Phillip Sharp ve Richard Roberts'ın laboratuvarlarında, birbirinden bağımsız olarak bulunmuştur. Adenovirus, gen ifadesini çalışmak için faydalı bir modeldir, çünkü viral genom $3.5x10^4$ baz çifti uzunluğundadır ve adenovirus mRNA'sı, enfekte hücrelerde yüksek düzeyde üretilir. Adenovirus mRNA'larını sınıflandırmak için bir yaklaşım, elektron mikroskobunda RNA-DNA hibridlerini inceleyerek, karşılık gelen viral genlerin yerleşimlerini saptamak olmuştur. RNA-DNA hibridleri tek iplikli DNA'dan ayırt edilebildiğinden, RNA transkriptlerinin bir DNA molekülü üzerindeki pozisyonu saptanabilir. Şaşırtıcı olarak, bu tip araştırmalar adenovirus mRNA'larının viral DNA'nın tek bir bölgesine hibridize olmadığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.3). Bunun yerine, tek bir mRNA molekülü viral genomun birkaç birbirinden ayrı bölgesine hibridize olmaktadır. Böylece, adenovirus mRNA'sı kalıp DNA'nın kesintisiz transkriptine karşılık gelmemekte ve mRNA viral DNA'nın değişik kısımlarından köken alan, birkaç birbirinden ayrı dizi bloğundan oluşturulmaktadır. Bunun, daha sonra Bölüm 6'da detaylı olarak tartışılacak olan **RNA kesilip-eklenmesi** aracılığıyla olduğu gösterilmiştir.

Adenovirusta intronların bulunmasından kısa bir süre sonra, ökaryot hücrelerin klonlanmış genlerinde benzer gözlemler yapılmıştır. Örneğin, RNA DNA hibritlerinin elektron mikroskobuyla analizi ve daha sonra klonlanmış genomik DNA'lar ve cDNA'ların nükleotidlerinin dizilenmesi, fare globin geninin kodlayan bölgesinin (hemoglobinin β alt birimini kodlar) mRNA'dan kesilerek ayrılan iki intron ile bölünmüş olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4). Birçok ökaryot geninin intron-ekson yapısı çok karmaşıktır ve intron dizilerindeki



Şekil 4.2 Ökaryot genlerinin yapısı Çoğu ökaryot gende kodlamayan diziler (intronlar) tarafından bölünmüş kodlayan dizi parçaları (eksonlar) vardır. Hem eksonlar hem intronlar, uzun bir primer RNA transkripti oluşturacak şekilde transkribe olur. Daha sonra intronların kesilerek çıkartılması ile olgun mRNA oluşturulur.

ANAHTAR DENEY

İntronların Keşfi

Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 Late mRNA
Susan M. Berget, Claire Moore, and Phillip A. Sharp
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 74, 1977, pages 3171-3175

Philip Sharp

Richard Roberts

Bağlam

Moleküler klonlamadan önce, ökaryot hücrelerdeki mRNA sentezi hakkında çok az bilgi vardı. Ancak, bu olayın ökaryotlarda bakteride olduğundan daha karmaşık olduğu açıktı. Ökaryot mRNA'larının sentezi, hem transkripsiyona hem de primer transkriptlerin yapısını değiştiren işleme reaksiyonlarına gerek duymaktaydı. Daha da önemlisi ökaryot mRNA'ları öncelikle çekirdekte bulunan uzun primer transkriptler olarak sentezleniyor ve daha sonra da sitoplazmaya ihraç edilen, çok daha kısa mRNA moleküllerine kesiliyor gibiydi.

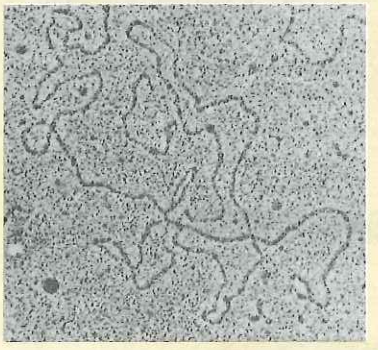
Bu işleme basamaklarının genel olarak primer transkriptlerin 5' ve 3' uçlarından dizilerin çıkarılmasıyla ilişkili olduğu düşünülüyordu. Bu modelde, uzun primer transkriptlerde bulunan mRNA'lar bölünmemiş DNA dizileri tarafından kodlanıyorlardı. Bu ökaryot mRNA görüşü birbirinden ayrı olarak Berget, Moore ve Sharp, ve Louise Chow, Richard Gelinas, Tom Broker ve Richard Roberts tarafından, kesilip-eklenmesinin tanımlanmasıyla önemli derecede değişti (An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA, *Cell* 12:1-8,1977).

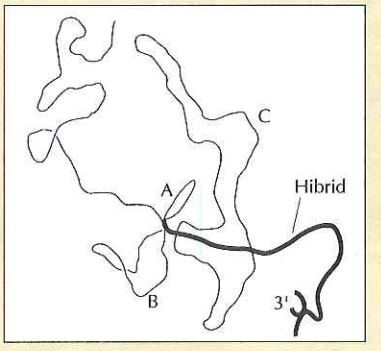
Deneyler

Kesip-ekleme mekanizmasını bulan her iki araştırma grubu, insan hücrelerinde mRNA sentezini araştırmak için temel avantajı, konak hücreden çok daha basit bir model oluşturması olan adenovirus 2'yi kullandı. Viral DNA virus partiküllerinden direkt olarak izole edilebilir ve viral yapısal proteinleri kodlayan mRNA'lar o kadar yüksek miktarlarda bulunur ki, enfekte hücrelerden direkt olarak saflaştırılabilir. Berget, Moore ve Sharp deneylerini, hekson adıyla bilinen bir viral yapısal polipeptidi kodlayan ve çok miktarda bulunan bir mRNA üzerine odakladılar.

Viral genomda hekson mRNA'sını haritalamak için saflaştırılmış mRNA adenovirus DNA'sına hibridize edildi ve hibrid molekülleri elektron mikroskobuyla incelendi. Beklendiği şekilde hekson mRNA'sının ana kısmı adenovirus DNA'sının daha önce hekson geni kapsadığı gösterilmiş kesim fragmanlarıyla hibridler oluşturdu. Ancak şaşırtıcı şekilde, hekson mRNA'sının 5' ucundaki diziler, mesajın ana kısmını kodlayan DNA dizilerine komşu dizilerle hibridize olmadı ve bu da mRNA'nın 5' ucunun viral genomda başka yerlerde bulunan dizilerden kaynaklandığını düşündürdü.

Bu olasılık hekson mRNA'sının hekson geninin yukarısında uzanan bir kesim fragmanına hibridizasyonu ile test edildi. Bu deneyde oluşan mRNA -DNA hibridleri karmaşık bir ilmik yapısı oluşturdular (Bkz. şekil). mRNA'nın ana kısmı daha önceden tanımlanmış hekson DNA dizileriyle uzun bir hibrid bölgesi oluşturdu.





Adenovirus DNA'sına hibridize edilmiş hekson mRNA'sının elektron mikrografisi ve çizimi. A, B, C olarak adlandırılmış tek iplikçikli ilmikler intronlara karşılık gelir.

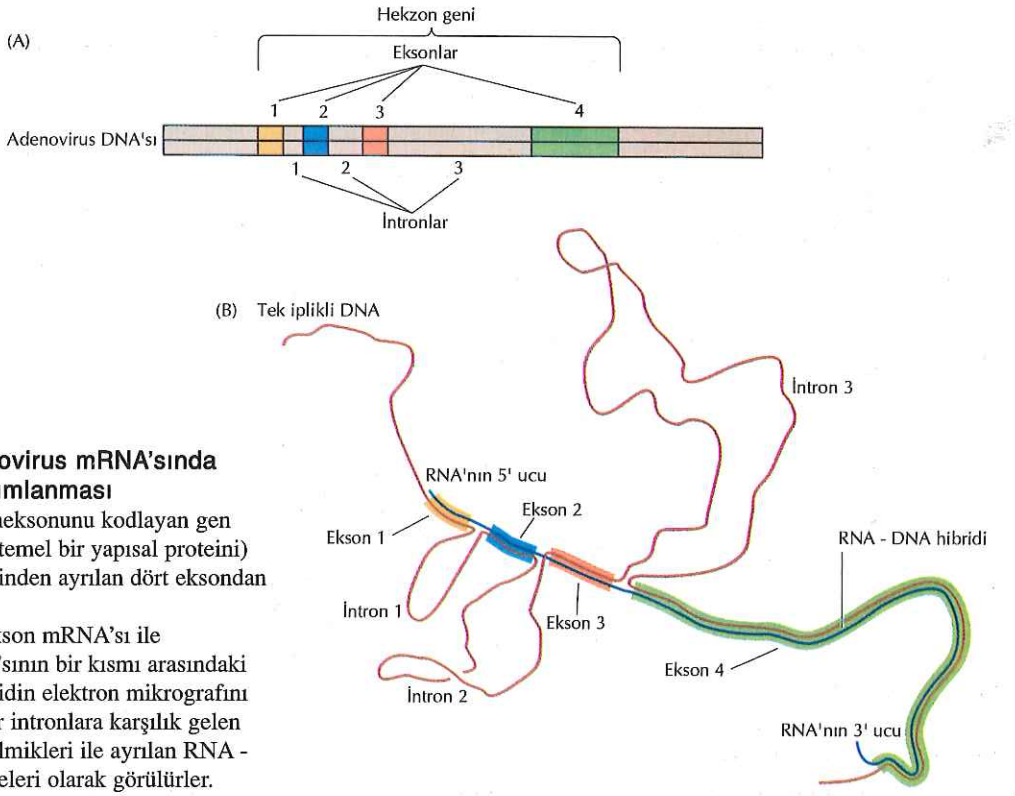
Çarpıcı olan, hekson mRNA'sının 5' ucunun, DNA'nın, birbirinden ve mesajın temel kısmından, büyük tek iplikçikli DNA ilmiklerle ayrılan, üç kısa yukarı bölgesine hibridize olmasıydı. Hekson mRNA'sının 5' ucundaki diziler böylece, viral genomun üç ayrı bölgesinden transkribe oluyordu ve bunlar da, uzun primer transkriptin işlem görmesi esnasında mRNA'nın ana bölümüne ekleniyordu.

Etki

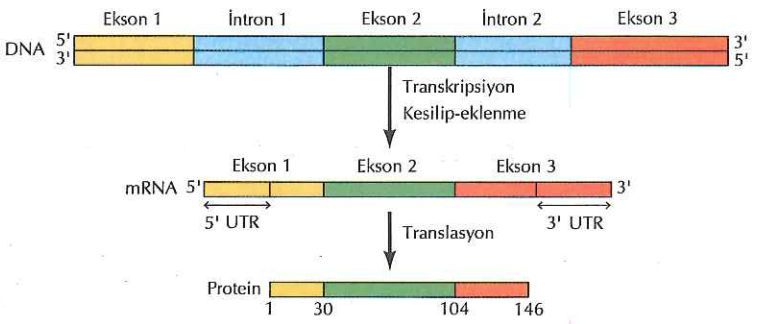
Adenovirus mRNA'sında kesip-eklenme işleminin bulunmasını, hemen hücresel mRNA deneyleri takip etti ve ökaryotik genlerin önceden beklenmeyen bir yapıda olduğu gösterildi. Kodlayan diziler sürekli değildi, aralarında intronlar mevcuttu ve bunlar kırpılma ile primer transkriptlerden çıkarılıyordu. Artık intronların, ökaryot genomdaki DNA'nın büyük kısmını oluşturduğu bilinmektedir ve intronların evrim ve gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolleri, aktif araştırma konularıdır. Kesilip-eklenme işleminin bulunması, bu beklenmeyen RNA işleme reaksiyonunun mekanizması konusunda da büyük ilgi uyandırdı. Bölüm 6'da tartışıldığı şekilde, bu çalışmalar hem gen ifadesinin düzenlenmesi için yeni mekanizmaları ortaya çıkarttı, hem de RNA'nın yeni katalitik faaliyetlerini gösterdi ve evrimin erken dönemlerinin kendi kendini çoğaltan RNA molekülleriyle olduğu hipotezini destekleyen çok önemli deliller sundu. Adenovirus mRNA'larının beklenmeyen yapısı böylece hücresel ve moleküler biyolojinin farklı alanlarında büyük bir etki yaptı.

DNA miktarı sıklıkla eksonlardakinden daha fazladır. İnsan genomunun dizisi, ortalama bir insan geninde yaklaşık 9 ekson bulunduğunu, bunların 8 intron tarafından ayrılmış olduğunu ve yaklaşık 30,000 baz çifti (30 **kilobaz** veya **kb**) genomik DNA üzerine dağıldığını göstermiştir. Eksonların genel toplamı sadece 2 kb kadardır, yani ortalama insan geninin %90'ından fazlası intronlardan oluşur.

İntronlar karmaşık ökaryotların çoğu geninde mevcuttur, ancak evrensel değillerdir. Örneğin histon genlerinin hemen hemen



Şekil 4.3 Adenovirus mRNA'sında intronların tanımlanması
(A) Adenovirus heksonunu kodlayan gen (viral partikülün temel bir yapısal proteini) üç intronla birbirinden ayrılan dört eksondan oluşur.
(B) Bu çizim hekson mRNA'sı ile adenovirus DNA'sının bir kısmı arasındaki hipotetik bir hibridin elektron mikrografını gösterir. Eksonlar intronlara karşılık gelen tek iplikli DNA ilmikleri ile ayrılan RNA - DNA hibrid bölgeleri olarak görülürler.



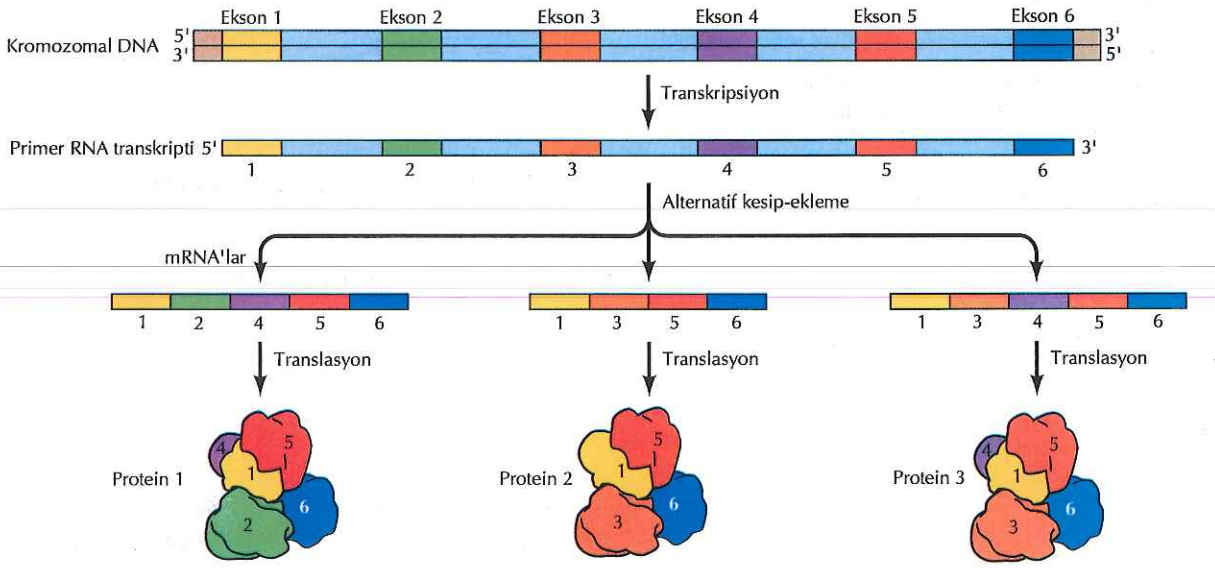
Şekil 4.4 Fare β-globin geni
Bu gende kodlama bölgesini üç ekson arasında bölen iki intron vardır. Ekson 1 amino asit 1 - 30'u, ekson 2 amino asit 31 - 104'ü ve ekson 3 amino asit 105 - 146'yı kodlar. Ekson 1 ve 3 ayrıca mRNA'nın, sırasıyla 5' ve 3' uçlarında proteine çevrilmeyen bölgeler (UTR'ler) kapsar.

hiçbirinde intron yoktur, yani intronlar ökaryot hücrelerinde gen işlevi için şart değildir. Ayrıca intronlar mayalar gibi basit ökaryotların çoğu geninde de bulunmazlar. Tersine, intronlar prokaryotlarda bazı nadir genlerde mevcuttur. İntronların varlığı veya yokluğu böylece prokaryot ve ökaryot genleri arasında kesin bir ayrım yapmaz, ancak intronlar, tüm genomik DNA'nın büyük bölümünü oluşturdukları yüksek ökaryotlarda (hem bitkiler hem hayvanlar) çok daha sık görülürler.

Çoğu intron, hücresel bir ürünün sentezini sağlamaz, ama bazıları işlevsel RNA veya proteinler kodlarlar. Ancak intronlar gen ifadesinin kontrol edilmesinde önemli rol oynarlar. Örneğin intronların varlığı, bir genin eksonlarının farklı kombinasyonlarda birleşmesini ve böylece aynı genden farklı proteinler sentezlenmesini sağlar. **Alternatif kesip-ekleme** (Şekil 4.5) adı verilen bu işlem karmaşık ökaryotların genlerinde sıklıkla görülür ve insan genomunun 30,000 – 40,000 geninin işlevsel repertuvarının genişletilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

İntronların ayrıca ekson karma adı verilen bir olayla, farklı genlerin protein kodlayan bölgeleri (eksonları) arasında rekombinasyonu kolaylaştırarak, evrimde önemli bir rol oynamış olabilecekleri düşünülmektedir. Eksonlar sıklıkla, işlevsel olarak ayrı protein bölgelerini kodlarlar, yani farklı genlerin intronları arasında rekombinasyon, protein kodlayan dizilerin yeni kombinasyonlarını bulunduran yeni genler oluşturur. Bu hipotez tarafından öngörüldüğü şekilde, DNA dizileme çalışmaları bazı genlerin birkaç başka genden gelen eksonların kimerası olduğunu göstermiştir ve bu da yeni genlerin intron dizileri arasında kombinasyonla oluşabileceği konusunda direkt bir delil oluşturmuştur.

İntronların evrimsel kökeni tartışma konusudur. Bir olasılık, intronların evrimde erken dönemde prokaryot ve ökaryot hücreler ayrılmadan önce var olduğudur. Bu hipoteze göre intronlar, günümüz hücrelerinin çok eski atalarında protein kodlama dizilerinin ilk oluşturulmasında önemli bir rol oynamışlardır. İntronlar daha sonra çoğu prokaryottan ve basit ökaryotlardan (örn., maya), hızlı replikasyona göre evrimsel seçilimleri ve bu organizmaların genomlarının verimlilik düzeylerinin artması sonucunda kaybolmuşlardır. Ancak hızlı hücre bölünmesi yüksek ökaryotlarda bir avantaj olmadığından, intronlar bu canlıların genomlarında korunmuştur. Alternatif olarak intronlar evrimde daha ileri dönemde, DNA dizilerinin sürekli protein kodlama dizisi olarak oluşmuş olan genlere katılması ile ortaya çıkmış olabilir. Bu durumda eksonların yerinin



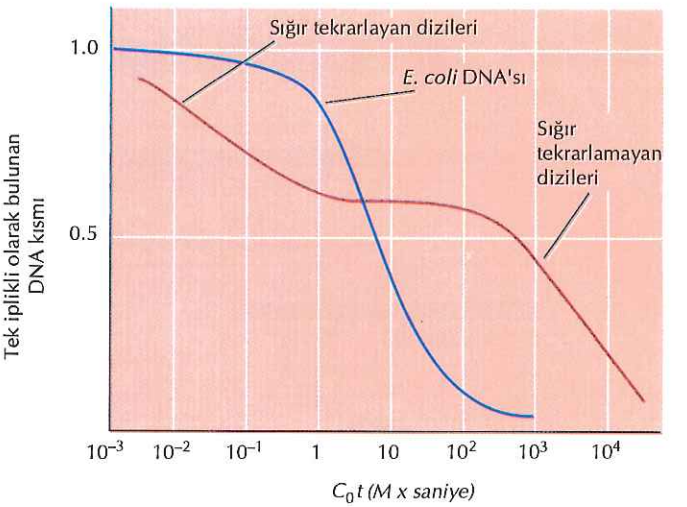
Şekil 4.5 Alternatif kesip-ekleme
Şekildeki gen, beş intronla ayrılan altı ekson kapsar. Alternatif kesip-ekleme bu eksonların farklı kombinasyonlarda birleşmesini sağlayarak, tek primer transkriptten üç farklı mRNA ve protein oluşmasını sağlar.

değiştirilerek karılması yüksek ökaryotlarda genlerin daha ileri gelişiminde önemli bir rol oynamıştır. Ancak, prokaryot ve ökaryot hücrelerin evrimsel ayrılmasından önce, protein kodlayıcı dizilerin ilk oluşturulmasında rolü olmayacaktır.

Tekrarlayan DNA Dizileri

İntronlar, yüksek ökaryot genomlarının büyük boyutuna belirgin katkıda bulunurlar. Örneğin, insanlarda intronlar total genomik DNA'nın %25'ini oluşturur. Ancak karmaşık ökaryot genomlarının daha da büyük bir kısmı, çok sayıda, tekrarlanan kodlamayan DNA dizilerinden oluşmuştur. Bazen genom başına yüz binlerce kopya olarak bulunabilen bu diziler, ilk kez Roy Britten ve David Kohne tarafından yapılan, hücresel DNA'ların denatüre fragmanlarının tekrar birleşme hızları üzerine çalışmaları ile gösterilmiştir (Şekil 4.6). DNA'nın denatüre iplikleri birbirlerine hibridize olurlar (birleşirler) ve çift iplikli molekülleri oluştururlar (bkz. Şekil 3.25). DNA tekrar bir araya gelmesi, iki moleküllü bir reaksiyon olduğundan (hibridize olmaları için denatüre DNA'nın iki ayrı ipliğinin birbiriyle çarpışması gerekir) tekrar bir araya gelme hızı, DNA ipliklerinin konsantrasyonuna bağlıdır. *E. coli* DNA'sının fragmanları denatüre edilip, birbirleriyle hibridize olmalarına olanak verildiğinde, her DNA dizini genomda bir kez bulunduğunda bekleneceği gibi, tüm DNA aynı hızda birleşti. Ancak memeli hücrelerinden elde edilen DNA fragmanlarının tekrar bir araya gelmesi, çok farklı bir paternde gerçekleşir. DNA fragmanlarının yaklaşık %50'si, dizilerin genom başına bir adet bulunduğu durumda beklenecek hızda tekrar bir araya gelirken, kalan kısmı beklenenden çok daha hızlı bir şekilde tekrar bir araya gelmiştir. Bu sonuçların yorumlanması bazı dizilerin çok sayıda kopyasının bulunduğu ve bu nedenle genomda sadece bir kez bulunan dizilere göre çok daha hızlı birleştikleri şeklindeydi. Bu deneyler memeli DNA'sının yaklaşık %50'sinin, bazıları 10^5 - 10^6 kez tekrarlanan, çok tekrarlı dizilerden oluştuğunu göstermektedir.

Tüm genomların dizilenmesiyle sonuçlanan daha ileri çalışmalar, bu çok tekrarlanan dizilerin birkaç tipini tanımlamıştır (Tablo 4.1). Bir



Şekil 4.6 DNA hibridleşmesi ile tekrarlayan dizilerin tanımlanması
E. coli ve sığır DNA fragmanlarının tekrar bir araya gelme kinetikleri, inkübasyon zamanı ile ilk DNA konsantrasyonun çarpımı olan C_0t işlevi olarak gösterilmiştir. *E. coli* DNA'sı, her DNA fragmanının 4.7 x 10^6 baz çiftlik bir genomda bir tek kez bulunmasıyla uyumlu olarak, sabit bir hızda tekrar bir araya gelir. Aksine sığır DNA fragmanları, bir araya gelirken iki ayrı belirgin basamak gösterir. DNA fragmanlarının yaklaşık %60'ı (tekrarlamayan diziler), daha büyük olan sığır genomunda (3 x 10^9 baz çifti), tek kopya olarak bulunan dizilerden bekleneceği şekilde, *E. coli* DNA'sından daha yavaş olarak bir araya gelir. Ancak, sığır DNA fragmanlarının diğer %40'ı (tekrarlayan diziler) *E. coli* DNA'sından daha hızlı bir araya gelir ve bu da, bu dizilerin birçok kopyasının bulunduğunu gösterir.

sınıf (**basit dizi tekrarı** denilen) 1-500 nükleotide kadar değişebilen kısa dizilerin, ardışık olarak binlerce kez tekrarlanmasıyla oluşur. Örneğin *Drosophila*'da bulunan bir tip basit dizi tekrarı, ACAAACT şeklindeki yedi nükleotidlik birimin birbirini takip eden tekrarlarından oluşur. Belli baz yapılarından dolayı birçok basit dizili DNA, genomik DNA'nın geri kalan kısmından CsCℓ yoğunluk gradiyentlerinde denge santirfügasyonu ile ayrılabilir. DNA'nın yoğunluğu baz yapısıyla belirlenir ve AT'den zengin diziler GC'den zengin dizilerden daha az yoğundur. Bu nedenle AT'den zengin basit bir DNA dizisi, CsCℓ gradiyentlerinde *Drosophila*'nın genomik DNA'sının büyük kısmından daha az yoğunlukta bant oluşturur (Şekil 4.7). Bu tip, tekrarlayan dizili DNA'lar, ana DNA kısmından farklı "uydu (satellit)" olarak bant oluştururlar. Bunlara genellikle **"uydu DNA'lar"** adı verilir. Diziler genom başına milyonlarca kez tekrarlanır. Bu da yüksek ökaryotların DNA'sının yaklaşık %10'unu oluşturur. Basit dizili DNA'lar transkribe olmaz ve işlevsel genetik bilgi taşımaz. Ancak bazıları, bu bölümün sonraki kısmında tartışıldığı şekilde, kromozom yapısında önemli roller oynarlar.

Başka tekrarlayan DNA dizileri, ardışık tekrarlanma yerine, tüm genoma serpilmiş olarak bulunurlar. Bu dağılmış tekrarlayan elemanlar, genom büyüklüğüne büyük katkıda bulunur ve insan genomik DNA'sının yaklaşık %45'ini oluşturur. Bu dizilerin en sık görülen iki sınıfı **SINE**'ler (serpiştirilmiş kısa elemanlar) ve **LINE**'lerdir (serpiştirilmiş uzun elemanlar). SINE'ler 100-300 baz

TABLO 4.1 İnsan Genomunda Tekrarlanan Diziler

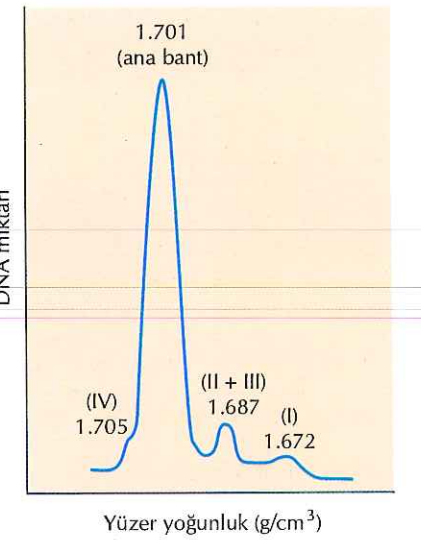
Dizi tipi	Kopya sayısı	Genomun yüzdesi
Basit dizili tekrarlar[a]	>1,000,000	~%10
Retrotranspozonlar		
LINE'ler	850,500	%21
SINE'ler	1,500,000	%13
Retrovirus gibi unsurlar	450,000	%8
DNA transpozonlar	300,000	%3

[a] Basit-tekrar dizilerinin kapsamı insan genomundaki heterokromatin yüzdesinden tahmin edilmektedir.

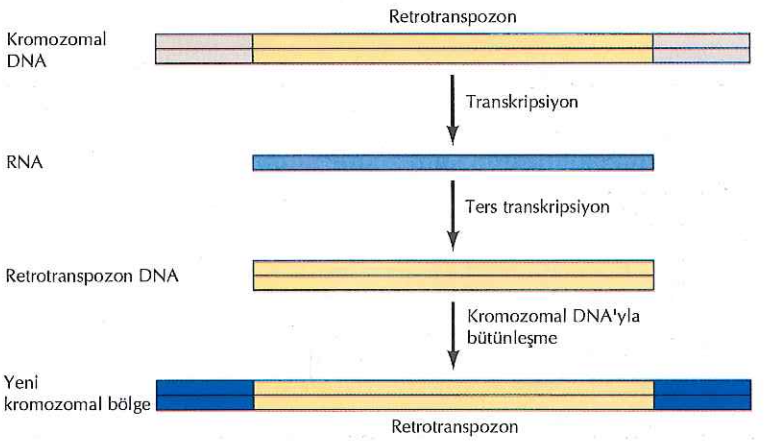
çifti uzunluğundadır. Genomda yaklaşık 1.5 milyon bu tip dizi, dağılmış durumdadır ve toplam insan DNA'sının %13'ünü oluşturur. SINE'ler RNA'ya transkribe olsa da, protein kodlamazlar ve işlevleri bilinmemektedir. Majör insan LINE'leri 6-8 kb uzunluğundadır, ancak LINE'lerden köken alan tekrarlayan dizilerin çoğu daha kısadır ve ortalama büyüklükleri 1kb civarındadır. Genomda yaklaşık 850,000 tekrarlayan LINE dizisi vardır ve insan DNA'sının %21'ini oluşturur. LINE'ler transkribe olur ve en azından bazıları, protein kodlarlar ve SINE'lerde olduğu gibi hücre fizyolojisinde bilinen bir işlevleri yoktur.

Hem SINE'ler hem LINE'ler, yer değiştirebilen elemanlara örnektir, yani genomik DNA'da farklı bölgelere hareket etme yetenekleri vardır. Bölüm 5'de detaylı şekilde açıklandığı gibi, hem SINE'ler hem de LINE'ler **retrotranspozonlardır,** yani yer değiştirmeleri ters transkripsiyon aracılığıyla olur (Şekil 4.8). Bir SINE veya LINE'nin RNA kopyası hücre içinde revers transkriptaz tarafından DNA'ya çevrilir ve yeni DNA kopyası genomda yeni bir bölgeyle bütünleşir. Dağınık tekrarlayan dizilerin üçüncü bir sınıfı, retroviruslara benzer ve **retrovirus benzeri elemanlar** olarak adlandırılır. Bunlar da, genomda ters transkripsiyon ile hareket eder. İnsan retrovirus benzeri elemanlar yaklaşık 2-10kb uzunluğundadır. İnsan genomunda yaklaşık 450,000 retrovirus benzeri eleman vardır ve insan DNA'sının yaklaşık %8'ini oluştururlar. Bunun aksine, dağınık tekrarlayan elemanların dördüncü sınıfı (**DNA transpozonlar**) ters transkripsiyon ile hareket yerine, genom içinde kopyalanarak ve tekrar DNA'ya katılarak hareket ederler. İnsan genomunda yaklaşık 300,000 kopya DNA transpozonu vardır ve bunlar 80-3,000 baz çifti uzunluğunda olup insan DNA'sının yaklaşık %3'ünü oluştururlar.

Böylece insan genomunun yaklaşık yarısı, replike olmuş ve genom içinde RNA veya DNA aracılarıyla hareket eden, serpiştirilmiş tekrarlayan elemanlardan oluşur. Bu elemanların büyük kısmının, RNA aracıları sayesinde yer değiştirmesi önemlidir ve bu şekilde ters transkripsiyon, insan genomunun %40'ından fazlasının oluşmasından sorumludur. Bu dizilerden bazıları gen ifadesinin düzenlenmesine yardımcı olabilir, ama çoğu serpiştirilmiş tekrarlayan dizinin hücreye bir katkısı yok gibidir. Bunun yerine "bencil DNA elemanları" gibidirler ve konağa selektif bir avantaj sağlamaktan çok, genom içinde çoğalma yetenekleri ile seçilmiş gibidirler. Ancak bazı durumlarda, yer değiştirebilen elemanlar, gen yeniden düzenlenmelerini uyararak ve genetik çeşitliliğin oluşmasına katkıda bulunarak önemli evrimsel roller oynamışlardır.



Şekil 4.7 Uydu DNA
Drosophila DNA'sının bir CsCl gradientinde denge santrifügasyonu, yüzer yoğunlukları (g/cm^3 olarak) 1,672, 1,687 ve 1,705 olan uydu DNA'ları (I-IV olarak gösterilmiş) ana genomik DNA bandından (yüzer yoğunluk 1,701) ayırır.



Şekil 4.8 Retrotranspozonların hareketi
Kromozomal DNA'da bir bölgede bulunan retrotranspozon RNA'ya transkribe olur ve sonra da ters transkripsiyon ile tekrar DNA'ya dönüşür. Retrotranspozon DNA'sı bundan sonra yeni bir kromozomal bölgeyle bütünleşebilir.

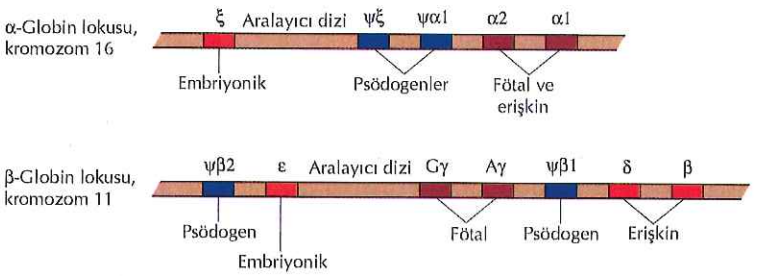
Gen Duplikasyonları ve Psödogenler

Ökaryot genomların büyük boyutuna katkıda bulunan başka bir faktör, birçok genin, bir kısmı genellikle işlevsel olmayan, çok sayıda kopya olarak bulunmasıdır. Bazı durumlarda, ribozomal RNA'lar ve histonlar gibi büyük miktarlarda gerekli proteinler ve RNA'ları üretmek için çok sayıda gen kopyası gereklidir. Başka durumlarda, bir ilişkili genler grubunun (bir **gen ailesinin**) farklı üyeleri farklı dokularda veya gelişmenin farklı evrelerinde transkribe olabilir. Örneğin, hemoglobinin α ve β alt birimlerinin ikisi de insan genomunda gen aileleri tarafından kodlanır ve bu ailelerin farklı üyeleri embriyonik, fetal ve yetişkin dokularda ifade edilir (Şekil 4.9). Birçok gen ailesinin (örn., globin genleri) üyeleri, DNA'da bir bölgede toplanmıştır; diğer bazı gen ailelerinin üyeleri ise farklı kromozomlara dağılmışlardır.

Gen ailelerinin, atalardan gelen orijinal bir genin duplikasyonu ile ve ailenin farklı üyelerinin daha sonra, evrim sürecinde mutasyonlar sonucunda birbirinden ayrılmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Böyle bir ayrılma, farklı dokularda veya gelişmenin farklı evrelerinde işlev görecek şekilde optimize olmuş, ilişkili proteinlerin evrimine yol açabilir. Örneğin, fötal globinlerin oksijene afinitesi, yetişkin globinlerinden daha yüksektir ve bu farklılık fötusun maternal dolaşımdan oksijen almasını sağlar.

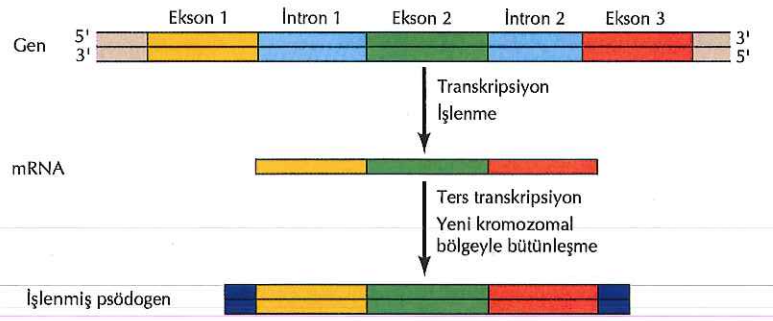
Ancak bekleneceği şekilde tüm mutasyonlar gen işlevini geliştirmez. Bunun yerine, bazı gen kopyalarında, bir işlevsel gen ürünü oluşturma yeteneğinin kaybıyla sonuçlanan uzun süreli mutasyonlar da mevcuttur. Örneğin, insan α ve β globin geni ailelerinin herbirinde mutasyonlarla inaktive olmuş iki gen bulunur. Bu tip işlevsel olmayan gen kopyaları (**psödogenler** adı verilir), işlevsel bir genetik katkıda bulunmadan ökaryot genomun büyüklüğünü artıran evrimsel kalıntıları simgelerler.

Gen duplikasyonları iki farklı mekanizmayla oluşabilir. Birincisi, DNA'nın bir parçasının duplikasyonu ve bir DNA dizisi bloğunun genomda yeni bir yere transferi ile sonuçlanır. Bu tip DNA duplikasyonları 1 kb'den 50 kb'ye kadar dizileri kapsayabilir ve insan genomunun yaklaşık %5'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Alternatif olarak genler, mRNA'nın ters transkripsiyonu ve daha sonra cDNA kopyasının yeni bir kromozomal bölgeye entegrasyonu ile duplike olabilir (Şekil 4.10). Bu tip gen duplikasyonu, RNA aracılarıyla hareket eden tekrarlayan elemanların yer değiştirmesine benzer ve intron ve genin mRNA'ya transkripsiyonunu yönlendiren



Şekil 4.9 Globin geni aileleri

İnsan α ve β globin gen ailelerinin üyeleri, sırasıyla, kromozom 16 ve 11'de toplanmışlardır. Her ailede embriyonik, fötal ve yetişkin dokularda, spesifik olarak ifade edilen genler ve ayrıca işlevsel olmayan gen kopyaları (psödogenler) bulunur.



Şekil 4.10 Bir işlenmiş psödogenin oluşması
Bir gen, intronların çıkartılmış olduğu bir mRNA oluşacak şekilde, transkribe olur ve işlenir. mRNA, revers transkriptaz ile kopyalanır ve böylece intronları bulunmayan cDNA kopyası ortaya çıkar. Kromozomal DNA ile bütünleşme bir işlenmiş psödogenin oluşmasına yol açar.

normal kromozomal dizileri bulunmayan, bir gen kopyası oluşturur. Bunun sonucunda ters transkripsiyon ile bir genin duplikasyonu genellikle bir **işlenmiş psödogen** adı verilen inaktif bir gen kopyasına yol açar. İnsan genomunda birkaç bin adet işlenmiş psödogen bulunduğu tahmin edilmektedir.

Yüksek Ökaryot Genomların Yapısı

Yüksek ökaryotların genomik karmaşıklığına katkıda bulunan, birkaç tip kodlamayan DNA'yı tartıştıktan sonra hücre genomunun yapısına genel olarak bakmak ilgi çekecektir. Bakteriyel genomlarda DNA'nın büyük kısmı protein kodlar. Örneğin, *E. coli* genomu yaklaşık 4.6×10^6 baz çifti uzunluğundadır, yaklaşık 4,000 gen kapsar ve DNA'nın yaklaşık %90'ı protein kodlayan dizi olarak kullanılır. Buna karşılık maya genomu, 12×10^6 baz çiftinden oluşur ve *E. coli* genomunun büyüklüğünün yaklaşık 2.5 katı büyüklüktedir, fakat oldukça yoğun yapıdadır. *Saccharomyces cerevisiae*'nın genlerinin sadece %4'ü intron kapsar ve bunlar genellikle kodlama dizisinin başlangıcına yakın, tek bir küçük intron halindedir. Maya genomunun yaklaşık %70'i protein kodlayan dizi olarak kullanılır ve bu, toplam, yaklaşık 6,000 protein ifade eder.

C.elegans ve *Drosophila*'nın nisbeten basit hayvan genomları maya genomunun 10 katı büyüklüktedir, ancak sadece iki veya üç kat fazla gen kapsarlar. Bu basit hayvan genomlarında daha fazla intron ve daha çok tekrarlayan dizi vardır ve bu şekilde protein kodlayan diziler *C.elegans* genomunun sadece yaklaşık %25'ine ve *Drosophila* genomunun da yaklaşık %13'üne karşılık gelir. Model bitki *Arabidopsis*'in genomunda, benzer sayıda gen vardır ve genomun yaklaşık %26'sı protein kodlayan dizilere karşılık gelir.

Daha yüksek hayvanların (insanlar gibi) genomu, *C.elegans* ve *Drosophila*'dan yaklaşık 20-30 kat daha büyüktür. Ancak, insan genom dizisinin çözülmesinin getirdiği büyük bir sürpriz, insan genomunda sadece 30,000 - 40,000 gen bulunmasıydı ve bu da *C. elegans* veya *Drosophila* genomundaki genlerin sayısının sadece iki katıdır. Öyle görünmektedir ki, insan genomunun sadece %1-1,5'luk kısmı protein kodlayan dizilerden oluşmaktadır. Genomun yaklaşık %25'i intronlardan oluşur ve %60'dan fazlası çeşitli tipte tekrarlayan ve duplike DNA dizilerinden oluşurken, kalan kısım ise psödogenler, genler arasındaki tekrarlanmayan aralayıcı diziler ve mRNA'ların 5' ve 3' uçlarında bulunan, proteine çevrilmeyen ekson dizilerinden oluşur. Yüksek ökaryotların genomlarının artmış uzunluğu, böylece, esas olarak daha fazla sayıda gene değil, çok miktarda tekrarlayan dizi ve intron varlığına bağlıdır.

Kromozomlar ve Kromatin

Çoğu ökaryot genomunun, prokaryotlarınkinden çok daha karmaşık olması yanı sıra, ökaryot hücrelerin DNA'sı prokaryot hücrelerinkinden farklı organize olmuştur. Prokaryot genomları, genellikle çembersel DNA molekülleridir ve tek bir kromozomda bulunur. Aksine, ökaryotların genomları, her biri bir doğrusal DNA molekülü kapsayan, çok sayıda kromozomdan oluşur. Değişik türler arasında kromozomların sayı ve büyüklüğü çok farklı olsa da (Tablo 4.2), temel yapıları tüm ökaryotlarda aynıdır. Ökaryotik hücrelerin DNA'sı, bu DNA'yı hücre nükleusunda düzenli bir şekilde paketleyen küçük bazik proteinlere (histonlar) sıkıca bağlıdır. Çoğu ökaryotik DNA'ların büyüklüğü düşünüldüğünde, bu görev oldukça önemlidir. Örneğin, bir insan hücresindeki DNA'nın toplam açılmış uzunluğu yaklaşık 2 m'dir, ancak, bu DNA'nın sadece 5-10 μm çapındaki bir çekirdeğe sığması gerekir.

Kromatin

Ökaryot DNA ve proteinlerden oluşan komplekslere **kromatin** adı verilir ve genel olarak, DNA'nın yaklaşık iki katı protein içerirler. Kromatinin temel proteinleri, negatif yüklü DNA molekülüne bağlanmayı kolaylaştıran bazik amino asitleri (arjinin ve lizin) yüksek oranda bulunduran küçük proteinler olan **histonlardır**. Beş temel tip histon vardır (H1, H2A, H2B, H3 ve H4), ve farklı ökaryot türleri arasında çok benzerdirler (Tablo 4.3). Histonlar ökaryot hücrelerde çok bol miktarda bulunan proteinlerdir ve oluşturdukları kütle, hücrenin DNA'sına yaklaşık olarak eşittir. Kromatin ayrıca, hemen hemen eşit kütle oluşturacak şekilde, çok çeşitli histon dışı kromozomal proteinler kapsar. Bu proteinlerin binden fazla farklı tipi vardır ve DNA replikasyonu ve gen ifadesi dahil çeşitli aktivitelerde rol oynarlar.

TABLO 4.2 Ökoryatik Hücrelerin Kromozom Sayıları

Organizma	Genom büyüklüğü (Mb)[α]	Kromozom sayısı[α]
Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)	12	16
Sümüksü mantar (*Dictyostelium*)	70	7
Arabidopsis thaliana	125	5
Mısır	5,000	10
Soğan	15,000	8
Zambak	50,000	12
Nematod (*Caenorhabditis elegans*)	97	6
Meyve sineği (*Drosophila*)	180	4
Kurbağa (*Xenopus laevis*)	3,000	18
Akciğerli balık	50,000	17
Tavuk	1,200	39
Fare	3,000	20
İnek	3,000	30
Köpek	3,000	39
İnsan	3,000	23

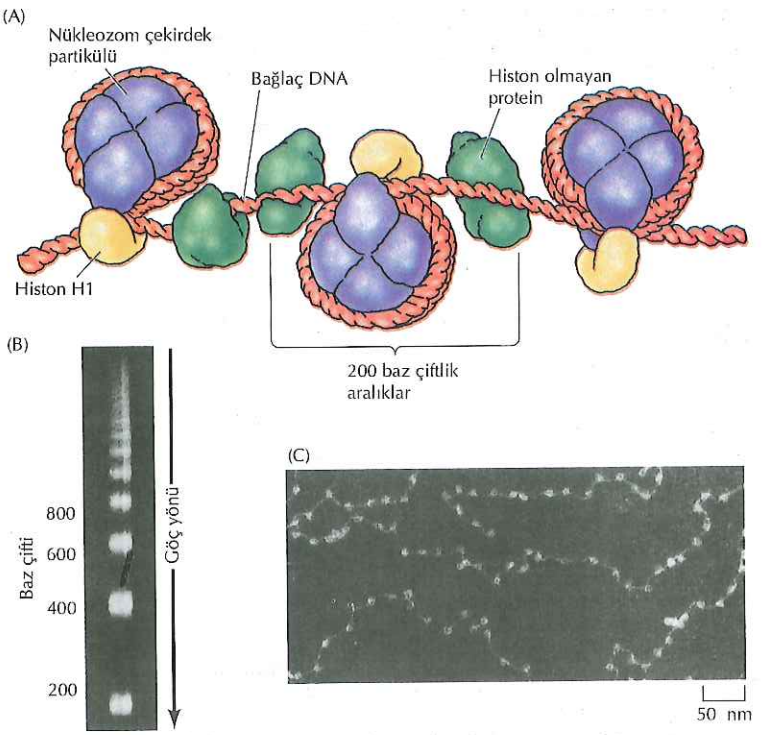
[α] Hem genom büyüklüğü hem kromozom sayısı haploid hücreler içindir.
Mb = milyon baz çifti.

TABLO 4.3 Histon Proteinleri

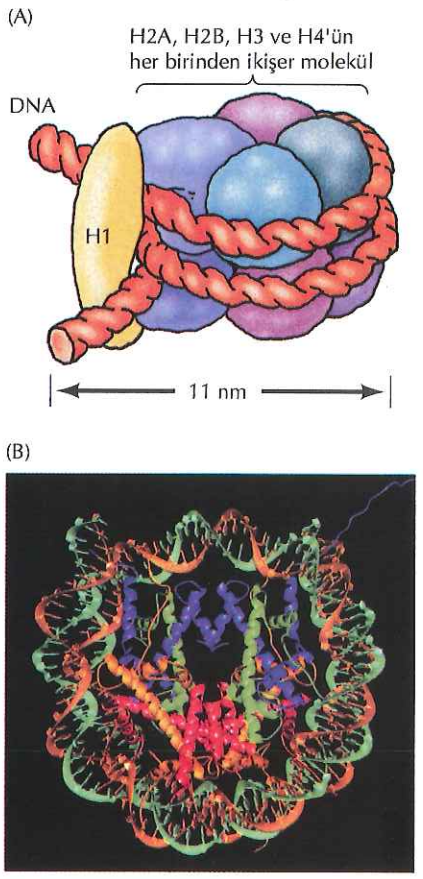
Histon[a]	Moleküler ağırlık	Amino asit sayısı	Lizin + arjinin yüzdesi
H1	22,500	244	30.8
H2A	13,960	129	20.2
H2B	13,774	125	22.4
H3	15,273	135	22.9
H4	11,236	102	24.5

[a] Veriler tavşan (H1) ve sığır histonları için geçerlidir.

Kromatinin temel yapısal birimi olan **nükleozom,** ilk kez Roger Kornberg tarafından 1974'de tanımlanmıştır (Şekil 4.11). İki tip deney, Kornberg'in nükleozom modelini önermesine yol açmıştır. İlk olarak, kromatinin mikrokoksik nükleaz (DNA'yı parçalayan bir enzim) ile kısmi sindiriminin, yaklaşık 200 baz çifti uzunluğunda DNA fragmanları oluşturduğu saptanmıştır. Bunun aksine, çıplak DNA'nın, (proteinlerle bağlantılı olmayan) benzer şekilde sindirimi, rasgele büyüklükteki fragmanların oluşturduğu yayma görüntüsüne yol açmıştır. Bu sonuçlar, kromatinde, DNA'ya protein bağlanmasının DNA bölgelerini nükleaz sindiriminden koruduğu ve böylece, enzimin DNA'ya sadece yaklaşık 200 baz çifti ile ayrılmış bölgelerde saldırabildiğini düşündürmüştür. Bu düşünceyle uyumlu olarak, elektron mikroskopisi kromatin liflerinin boncuk şekilde bir görünümü olduğunu ve boncukların yaklaşık 200 baz çiftilik aralıklarla yerleştiğini ortaya çıkarmıştır. Böylece hem nükleaz sindirimi hem elektron mikroskobik çalışmalar, kromatinin 200 baz çiftlik tekrarlanan birimlerden oluştuğunu kanıtlamış ve bunlara nükleozomlar adı verilmiştir.



Şekil 4.11 Kromatinin nükleozoma organizasyonu
(A) DNA, nükleozom çekirdek partiküllerini oluşturan histonlar etrafına sarılmıştır ve histon H1 ile mühürlenmiştir. Nonhiston proteinler, nükleozom çekirdek partikülleri arasındaki bağlaç DNA'ya bağlanır. (B) Kromotinin mikrokoksik nükleazla kısmi sindirimi sonucu ile elde edilmiş DNA fragmanlarının jel elektroforezi. Nükleozom çekirdek partikülleri arasındaki bağlaç DNA, özellikle hassastır ve bu nedenle kromatinin kısıtlı sindirimi, 200 baz çiftinin katlarına denk gelen fragmanlar oluşturur. (C) Bir uzatılmış kromatin lifinin, boncuklu yapısını gösteren elektron mikroskop görüntüsü. (B, Roger Kornberg Stanford Üniversitesi; C, Ada L. Olins ve Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory katkılarıyla.)

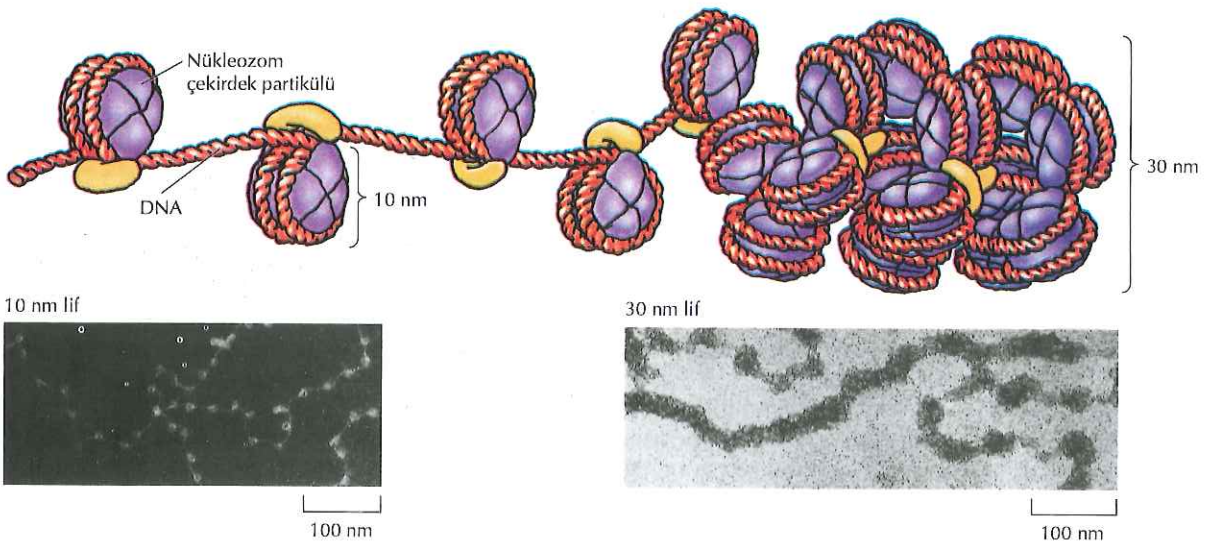


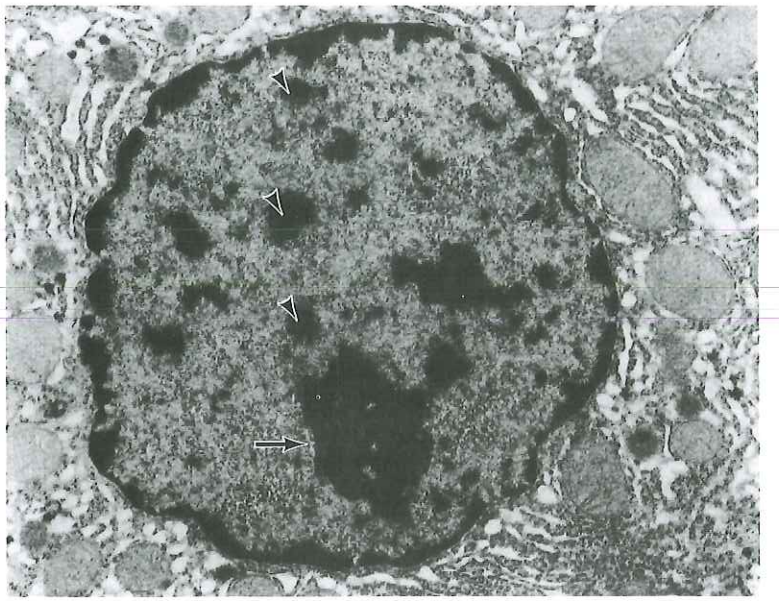
Şekil 4.12 Bir kromatozomun yapısı
(A) Nükleozom çekirdek partikülü, H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinden iki tane içeren bir histon oktameri etrafında 1.65 kez sarılı, 146 baz çifti uzunluğunda DNA'dan oluşur. Bir kromatozom, bir molekül H1 ile yerine kilitlenmiş iki tam döngü DNA (166 baz çifti) kapsar. (B) Nükleozom çekirdek partikülünün modeli. DNA omurgaları kahverengi ve turkuaz olarak gösterilmiştir. Histonlar mavi (H3), yeşil (H4), sarı (H2A) ve kırmızı (H2B) renklidir. (B, K. Luger et al., 1997 *Nature* 389: 251.)

Kromatinin mikrokoksik nükleaz ile daha ileri sindirimi elektron mikroskopide görülebilen boncuklara karşılık gelen partikülleri (**nükleozom kor partikülleri** adı verilir) ortaya çıkarır. Bu partiküllerin detaylı bir şekilde analizi, ikişer H2A, H2B, H3 ve H4'ten (çekirdek histonlar) oluşan bir histon çekirdek bölgesi etrafında 1.65 kez sarılmış, 146 DNA baz çifti kapsadıklarını göstermiştir (Şekil 4.12). Beşinci histon yani H1 molekülü, nükleozom kor partikülüne her girişinde, DNA'ya bağlanır. Bu, **kromatozom** adı verilen bir kromatin alt birimi oluşturur ve bu da histon çekirdek bölgesi etrafını sarılmış ve H1 tarafından (bağlayıcı histon) sabitlenmiş, 166 baz çifti DNA'dan oluşur.

DNA'nın histonlarla paketlenmesi, yaklaşık 80 baz çifti uzunluğunda olan, ortalama bağlaç DNA parçalarıyla ayrılan kromatozomlardan oluşan, yaklaşık 10 nm çaplı bir kromatin lifi oluşturur (Şekil 4.13). Elektron mikroskobunda bu 10 nm'lik lifin, nükleozom modelini düşündüren, boncuklu bir görünümü vardır. DNA'nın böyle bir 10 nm kromatin ipliği haline paketlenmesi, boyunu yaklaşık altı kez kısaltır. Kromatin daha sonra, yapısı halen tam olarak bilinmeyen 30 nm'lik liflere, sarmallar oluşturarak, daha fazla yoğunlaşabilir. Bu kromatin yoğunlaşması evresinde histon H1 molekülleri arasındaki etkileşimlerin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Şekil 4.13 Kromatin lifleri
DNA'nın nükleozomlara paketlenmesi yaklaşık 10 nm çaplı bir kromatin lifi oluşturur. Bu kromatin, her döngüsünde yaklaşık altı nükleozom kapsayan bir 30 nm'lik lif halinde sarmal oluşturarak daha da sıkışır. (Fotoğraflar, Ada L. Olins ve Donald E. Olins'in katkılarıdır, Oak Ridge National Laboratory.)



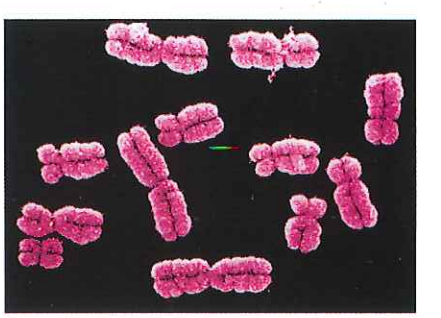


Şekil 4.14 İnterfaz kromatini
Bir interfaz nükleusunun elektron mikrografı. Ökromatin nükleusun her yanına dağılmıştır. Heterokromatin ok başı ile, nükleolus ok ile gösterilmiştir. (Ada L. Olins ve Donald E. Olins'in katkılarıyla, Oak Ridge National Laboratory.)

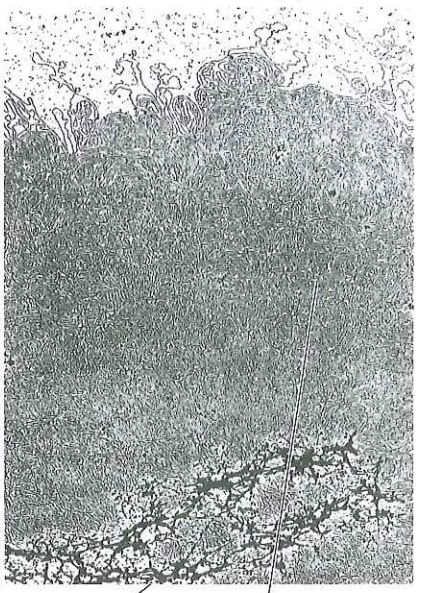
Kromatin kondansasyonunun düzeyi, hücrenin yaşam döngüsü sürecinde değişim gösterir. İnterfazdaki (bölünmeyen) hücrelerde kromatinin çoğu (**ökromatin** adı verilir) nispeten yoğun olmayan durumdadır ve çekirdek içerisinde dağılmıştır (Şekil 4.14). Hücre döngüsünün bu döneminde, gen transkripsiyonu olur ve DNA hücre bölünmesine hazırlanacak şekilde replike olur. İnterfaz nükleuslarındaki kromatinin çoğu, 30 nm'lik lifler halinde ve yaklaşık 50-100 kb DNA kapsayan büyük ilmiklere organize olmuş şekilde görünmektedir. Aktif olarak transkripsiyonu yapılan genler daha az yoğunlaşmış durumdadır ve bu da, bu DNA'yı transkripsiyon mekanizmalarına daha açık hale getirir. Kromatin yapısı böylece, Bölüm 6'da tartışılacağı şekilde, ökaryotlarda gen ifadesinin kontrolüyle çok yakından ilişkilidir.

Ökromatinin aksine, interfaz kromatininin yaklaşık %10'u (**heterokromatin** adı verilir), mitoza giren hücrelerin kromatinine benzeyen, çok yoğunlaşmış bir durumdadır. Heterokromatin transkripsiyonel olarak inaktiftir ve sentromerlerde ve telomerlerde bulunanlara benzeyen tekrarlayan DNA dizilerini kapsar.

Hücreler mitoza girdiğinde, kromozomları, yavru hücrelere dağıtabilmeleri için çok yoğunlaşmış hale gelir. 30 nm'lik kromatin lifleri, ilmiklerin kendi üzerlerine katlanmasıyla, mitotik hücrelerin kompakt metafaz kromozomlarını oluştururlar ve bunlarda, DNA'nın yaklaşık 10,000 kat yoğunlaşmış olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.15). Bu tip yoğunlaşmış kromatin artık RNA sentezi için bir kalıp olarak kullanılamaz ve bu nedenle mitoz sırasında transkripsiyon durur. Elektron mikroskop görüntüleri, metafaz kromozomlarındaki DNA'nın bir protein yapıya bağlı büyük ilmikler şeklinde organize



Şekil 4.15 Mitoz sırasında kromatin kondansasyonu
Metafaz kromozomlarının tarayıcı elektron mikroskop fotoğrafı. Yapay renklendirilmiştir. (Biophoto Associates, Photo Researchers Inc.)



Şekil 4.16 Metafaz kromozomlarının yapısı
Histonları uzaklaştırılmış olan metafaz kromozomlarının, protein yapı iskelesine bağlanan DNA ilmiklerinin elektron mikrografı. (J. R. Paulson ve U. K. Laemmli, 1977. *Cell* 12:817.)

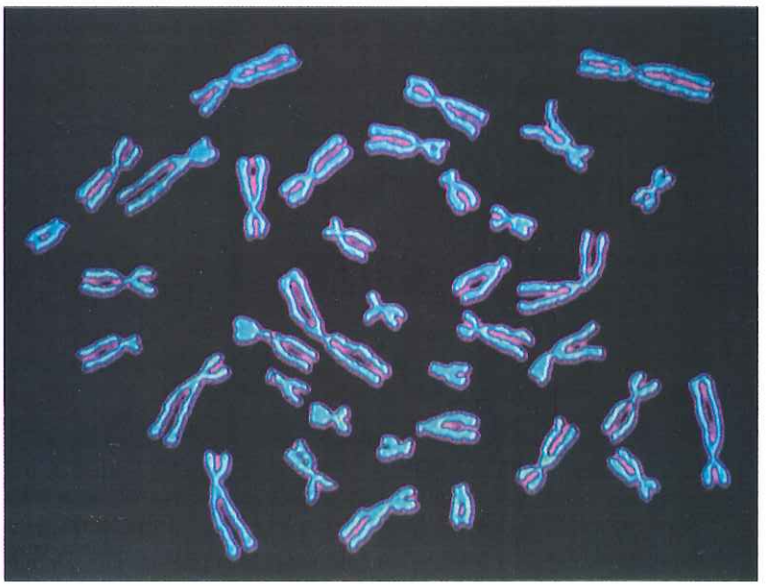
olduğunu göstermektedir (Şekil 4.16), ancak, şu anda bu çok yoğunlaşmış kromatinin ayrıntılı yapısını ya da kromatin yoğunlaşma mekanizmasını anlamış değiliz.

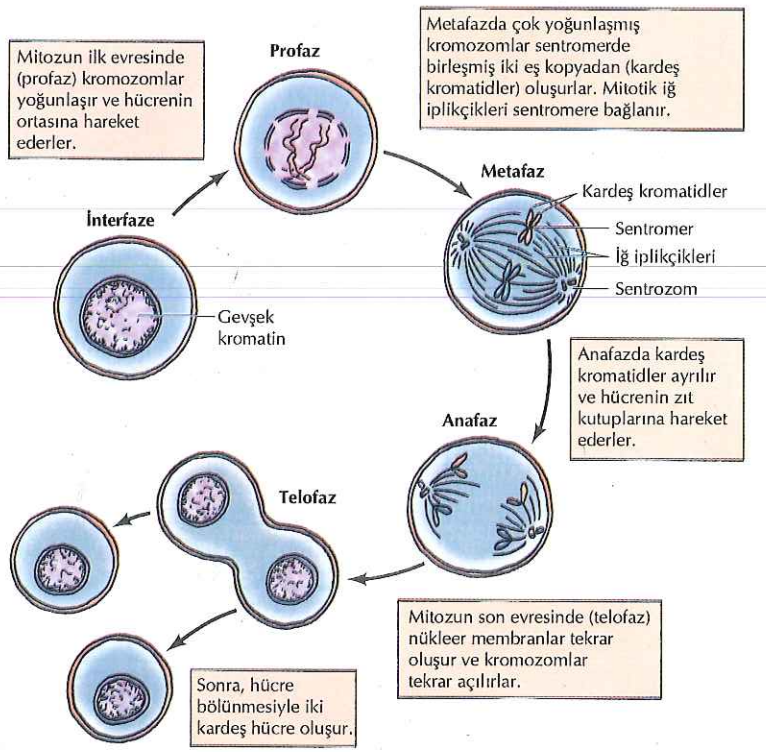
Metafaz kromozomları o kadar çok yoğunlaşmışlardır ki morfolojileri ışık mikroskobu ile incelenebilir (Şekil 4.17). Birkaç boyama tekniği, boyaların veya floresan boyaların, AT'den zengin DNA dizilerine GC'den zengin dizilere kıyasla tercihli bağlanmasının sonucu olarak dönüşümlü, açık ve koyu kromozom bantlarının karakteristik paternini ortaya çıkarır. Bu bantlar her kromozom için özgüldür ve farklı kromozom bölgelerini temsil eder. Genler, özgül kromozom bantlarına, *in situ* hibridizasyon ile lokalize edilebilir. Bu da DNA'nın metafaz kromozomlarına paketlenmesinin çok düzenli ve tekrarlanabilir bir olay olduğunu göstermektedir.

Sentromerler

Sentromer, mitoz esnasında duplike olmuş kromozomların, yavru hücrelere doğru dağılmasının sağlanmasında önemli bir rol oynayan, kromozomun özelleşmiş bir bölgesidir (Şekil 4.18). Hücresel DNA interfaz sırasında replike olarak, mitozun başlamasından önce, her kromozomdan iki kopya oluşturulmasını sağlar. Hücreler mitoza girerken kromatin yoğunlaşması, birbirinin tıpatıp aynı iki kardeş kromatidden oluşan metafaz kromozomlarının oluşumuna yol açar. Bu kardeş kromatidler sentromerde bir arada tutulur ve burası daralmış bir kromozomal bölge olarak görülür. Mitoz ilerledikçe mitotik iğin

Şekil 4.17 İnsan metafaz kromozomları
Bir metafaz hücresinden yayılan insan kromozomlarının mikroskop fotoğrafı. (Leonard Lessin/Peter Arnold, Inc.)



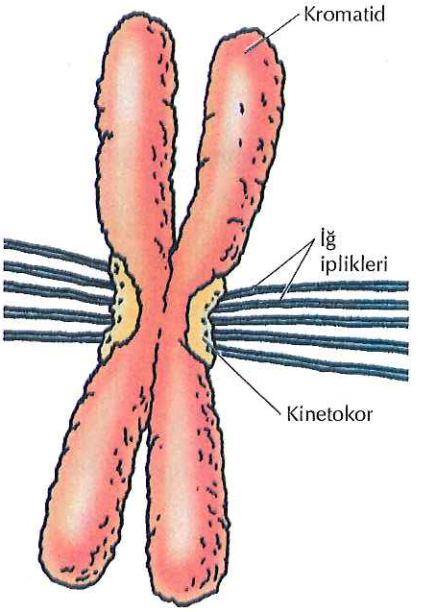


Şekil 4.18 Mitoz esnasında kromozomlar
DNA, interfaz esnasında replike olduğundan, hücrede mitoza girmeden önce her kromozomun birbirinin eşi olan iki kopyası mevcuttur.

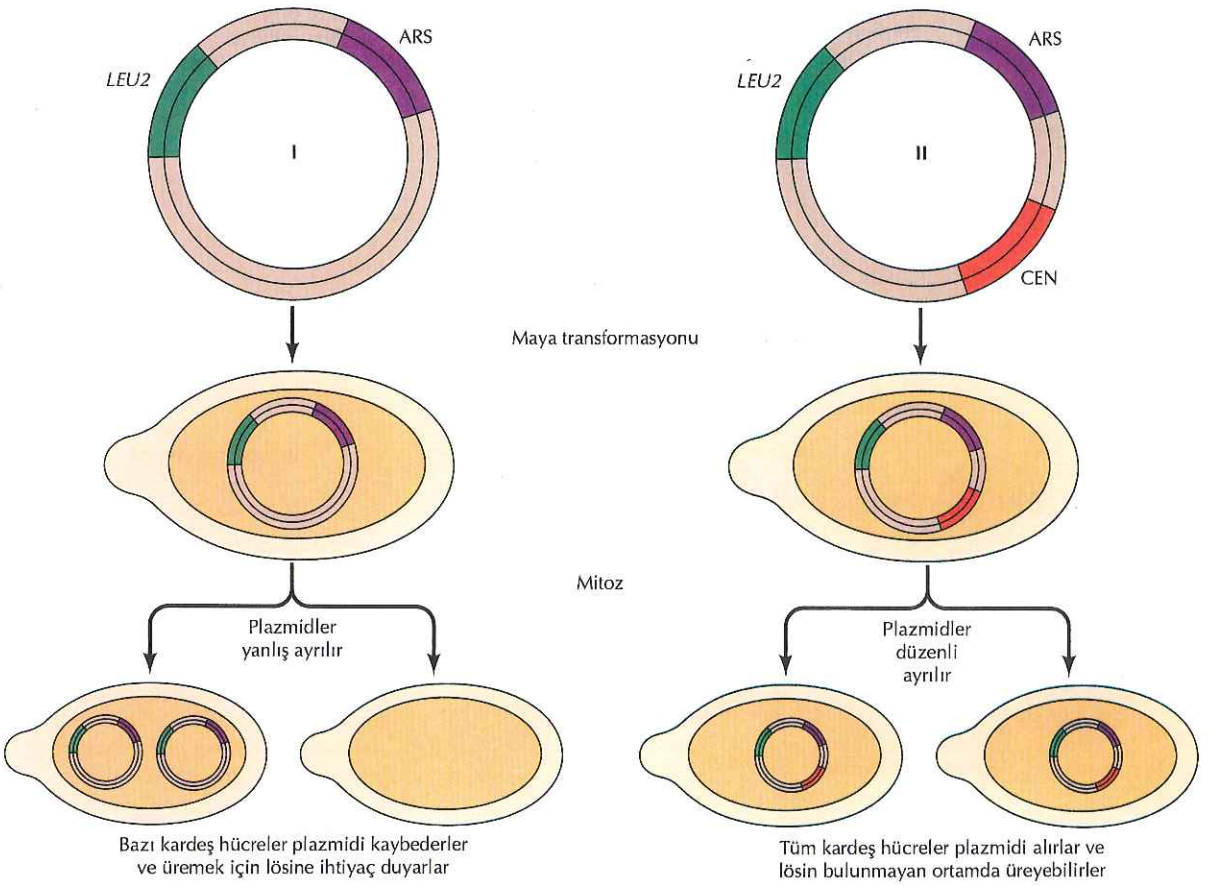
mikrotübülleri sentromere tutunur ve iki kardeş kromatid ayrılıp iğin karşıt kutuplarına hareket ederler. Mitozun sonunda nükleer zarlar tekrar oluşur, kromozomlar gevşer ve böylece her ebeveyn kromozomundan birer kopya içeren kardeş nükleuslar oluşur.

Sentromerler böylece, hem kardeş kromatidlerin birbiriyle ilişkiye girdiği yerler, hem de mitotik iğin mikrotübüllerinin bağlanma yeri olarak görev yaparlar. Birkaç sentromerle ilişkili proteinin bağlandığı **kinetokor** adı verilen özelleşmiş yapılar oluşturan, spesifik DNA dizilerinden oluşurlar (Şekil 4.19). Mikrotübüllerin kinetokor proteinlerine bağlanması, kromozomların mitotik iğe bağlanmasına aracı olur. Kinetokorla ilişkili proteinler daha sonra, kromozomların iğ iplikçikleri boyunca hareketlerini ve kromozomların kardeş nükleuslara ayrılmasını sağlayan "moleküler motorlar" olarak görev yaparlar.

Sentromerik DNA dizileri ilk kez mayalarda tanımlanmıştır ve burada, işlevleri plazmidlerin mitozda ayrılmasının izlenmesiyle çalışılmıştır (Şekil 4.20). İşlevsel sentromerlere sahip plazmidler, kromozomlar gibi ayrılırlar ve mitozdan sonra kardeş hücrelere eşit şekilde dağılırlar. Ancak, işlevsel bir sentromer yoksa, plazmid uygun şekilde ayrılmaz ve birçok kardeş hücre plazmid DNA'yı alamaz. Bu tip çalışmalar sentromer işlevi için gerekli dizilerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu tip deneyler, önce iyi çalışılmış bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'nın sentromer dizilerinin, üç dizi elemanından oluşan yaklaşık 125 baz çiftlik bölgede bulunduğunu



Şekil 4.19 Bir metafaz kromozomunun sentromeri
Sentromer, iki kardeş kromatidin metafazda birbirine bağlandıkları bölgededir. Özel proteinler sentromerik DNA'ya bağlanarak, iğ iplikçiklerinin bağlandığı yer olan, kinetokoru oluşturur.

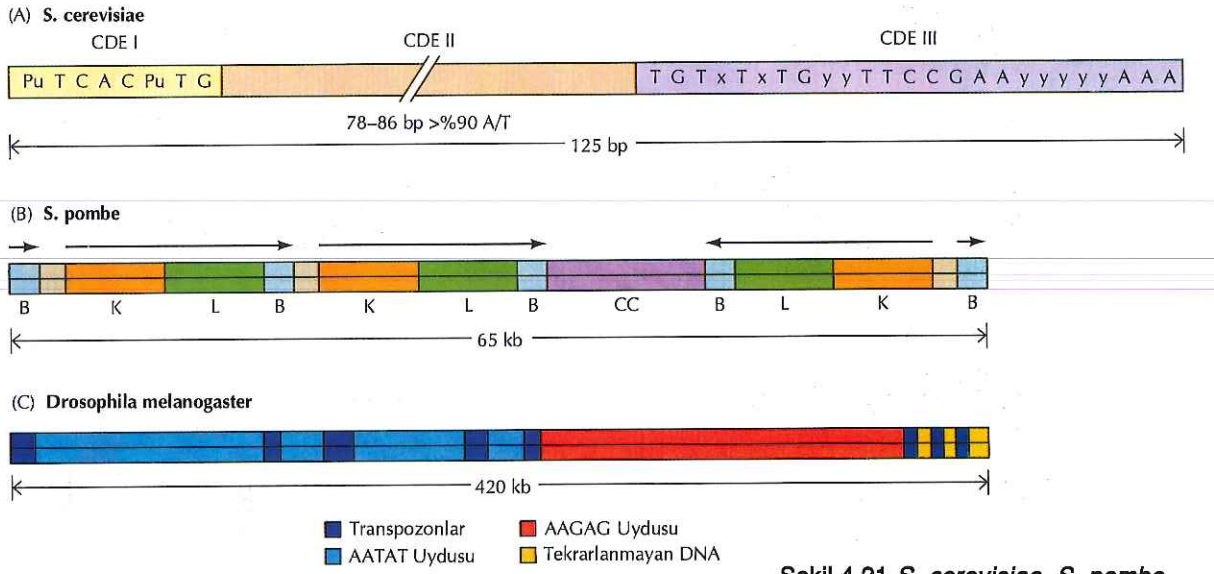


Şekil 4.20 Mayada sentromer deneyi
Her iki plazmid de mayada replikasyon orijini (ARS yani otonom olarak replike olabilen dizi) olarak hizmet veren DNA dizileri ve seçilebilir bir işaretleyici *(LEU2)* içermekte. Ancak, plazmid I'de sentromer yoktur ve bu nedenle mitoz esnasında yanlış ayrılma sonucu olarak sıklıkla kaybolur. Aksine, plazmid II'de bir sentromerin (CEN) varlığı yavru hücrelere düzenli olarak iletilmesini sağlar.

göstermiştir: Birbirinden 78-86 baz çifti uzaklıkta, AT'den çok zengin DNA'dan oluşan 8 ve 25 baz çifti uzunluğunda iki kısa dizi (Şekil 4.21A).

Ancak *S. cerevisiae*'da tanımlanmış kısa sentromer dizileri, diğer ökaryotlardaki durumu yansıtmıyor gibidir. Daha yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, bölünen maya *Schizosaccharomyces pombe*'nin sentromerlerini benzer bir işlevsel yaklaşımla tanımlamışlardır. *S.cerevisiae* ve *S.pombe*'nin ikisi de maya olmakla beraber, birbirlerinden, her birinin insandan farklı olduğu kadar, farklı görünmektedirler ve hücre biyolojileriyle çok farklıdırlar. Bu iki maya türü böylece, basit ve kolayca çalışılan ökaryot hücreler için, birbirlerini tamamlayan modeller oluştururlar. *S.pombe*'nin sentromerleri, DNA'da 40-100kb'lik bir yer kaplar ve *S.cerevisiae*'ninkilerden yaklaşık 1,000 kez büyüktür. Etrafında tekrarlayan diziler bulunan, 4-7 kb'lik tek-kopya DNA'dan ibarettir (Şekil 4.21B). Hem merkez bölgesi hem de çevredeki tekrarlayan diziler sentromer işlevi için gereklidir ve bu nedenle *S.pombe*'nin sentromerleri *S.cerevisiae*'ninkilerden çok daha karmaşık gibi görünmektedir.

Drosophila kromozomu üzerine çalışmalar, yüksek ökaryotlardaki bir sentromeri ilk kez karakterize etmiştir (Şekil 4.21C). *Drosophila* sentromeri, 420 kb büyüklüğündedir ve çoğu (%85'ten fazlası) AATAT ve AAGAG dizileri şeklinde, iki çok tekrarlayan uydu DNA'dan oluşur. Sentromerin geri kalan kısmı, *Drosophila* genomunda başka



Şekil 4.21 *S. cerevisiae, S. pombe* ve *Drosophila melanogaster* sentromerleri
(A) *S. cerevisiae* sentromer (CEN) dizileri 78 - 86 baz çifti (bp) AT'den zengin DNA (CDE II) ile ayrılmış iki kısa korunmuş diziden (CDE I ve CDE III) oluşur. Burada verilen diziler ayrı maya kromozomlarının sentromer dizilerinin analizinden elde edilmiş ortak dizilerdir. Pu = A veya G; x = A veya T; y = herhangi bir baz. (B) *S. pombe*'nin kromozom II'sindeki sentromerde dizilerin düzeni gösterilmektedir. Sentromer bir merkez kor (CC) benzersiz dizili DNA ve etrafında üç tekrarlayan dizi elemanının (B, K ve L) birbirini takip eden tekrarlarından oluşur. (C) *Drosophila* sentromeri iki uydu dizi, yer değiştirebilen elemanlar ve tekrarlanmayan DNA'dan oluşur.

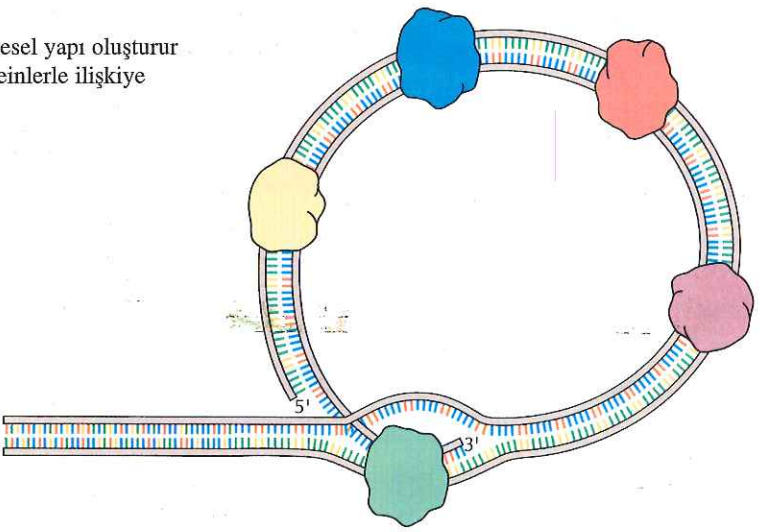
bölgelerde de bulunan, dağınık, yer değiştirebilen elemanlardan ve AT'den zengin DNA'dan oluşan bir tekrarlanmayan bölgeden oluşur. Uydu dizilerin ve yer değiştirebilen elemanların ve ayrıca tekrarlamayan DNA'nın delesyonu, işlevsel çalışmalarda sentromerin aktivitesini azaltmıştır. Bu nedenle hem tekrarlayan hem tekrarlamayan dizilerin kinetokor oluşumu ve sentromer işlevine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Arabidopsis* sentromerleri ise 500-1,000 kb büyüklüğündedir ve temel olarak çok tekrarlayan dizilerden oluşur.

Memeli sentromerleri, çok tekrarlayan uydu DNA dizilerinden oluşan, geniş heterokromatin bölgeleriyle karakterizedir. İnsanlar ve diğer primatlarda, primer sentromerik dizi, milyonlarca baz çifti boyunca ardışık tekrarlar halinde düzenlenmiş 171 baz çiftlik bir dizi olan α–uydu DNA'dır. α–uydu DNA'nın sentromerle ilişkili proteinleri bağladığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan deneyler, insan X kromozomunun sentromerik α–uydu dizisinin bir işlevsel sentromer olarak görev görmeye yeterli olduğunu göstermiştir. Ancak, α–uydu DNA'sı olmayan, işlevsel sentromerleri olan anormal insan kromozomları da tanımlanmıştır, yani, yüksek ökaryotlarda sentromer işlevi için gerekenler henüz tam olarak belirlenememiştir.

Telomerler

Ökoryatik kromozomların sonlarındaki **telomerler** adı verilen diziler, kromozom replikasyonu ve korunmasında çok önemli roller oynarlar. Telomerler, önceleri, kırık kromozomların ökoryatik hücrelerde kalıcı olmamaları nedeniyle kromozom uçlarında özel dizilere gerek olduğunu düşündürdüğünden farkedilmiştir. Daha sonra, *Tetrahymena* protozoasının telomerlerine, maya plazmid doğrusal DNA'sının sonlarına eklendiği, deneylerle gösterilmiştir. Telomerik DNA dizilerinin eklenmesi, bu plazmidlerin mayalarda doğrusal kromozom benzeri moleküller olarak replike olmasını sağlamıştır ve bu da doğrusal DNA moleküllerinin replikasyonu için, telomerlerin gerekli olduğunu direkt olarak göstermiştir.

Şekil 4.22 Bir telomerin yapısı
Telomer DNA'sı kendi üstüne dönerek bir dairesel yapı oluşturur ve kromozomların sonlarını koruyan bazı proteinlerle ilişkiye girer.



Birçok ökaryotun telomer DNA dizileri benzerdir ve bir iplikte G baz kümeleri kapsayan, basit dizili DNA tekrarlarından oluşur (Tablo 4.4). Örneğin, insanlarda ve diğer memelilerde telomer tekrarlarının dizisi AGGGTT'dir ve *Tetrahymena*'daki telomer tekrarı GGGGTT'dir. Bu diziler yüzlerce veya binlerce kez tekrarlanır ve bu şekilde, birkaç kilobaz uzunluğa erişip, tek iplikli DNA olarak sonlanır. Telomer DNA'sının tekrarlanan dizileri, kromozomların uçlarında ilmik oluşturur ve ayrıca, kromozom sonlarını yıkımdan veya birbirine birleşmekten koruyan birkaç protein bağlar (Şekil 4.22).

Telomerler, doğrusal DNA moleküllerinin uçlarının replikasyonunda çok önemli bir rol oynarlar (bkz. Bölüm 5). DNA polimeraz, uzayan bir DNA zincirini ilerletebilir, ancak, bir doğrusal DNA molekülünün ucunda yeni bir zincir sentezini başlatamaz. Bunun sonucunda, doğrusal kromozomların uçları, DNA polimerazın normal etkinliği ile replike edilemez. Bu problem, telomerik DNA dizilerini replike etmek için revers transkriptaz aktivitesi ile ilişkili özel bir mekanizmanın gelişmesiyle çözülmüştür. Telomerlerin korunmasının, hücrelerin yaşam süresi ve üreme kapasitesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olduğu anlaşılmaktadır ve bu nedenle telomerler ve telomeraz üzerine yapılan çalışmaların yaşlanma ve kanser gibi durumlara yeni açıklamalar getirebilmesi mümkündür.

TABLO 4.4 Telomerik DNA'lar

Organizma	Telomerik tekrar dizisi
Mayalar	
Saccharomyces cerevisiae	$G_{1\text{-}3}T$
Schizosaccharomyces pombe	$G_{2\text{-}5}TTAC$
Protozoalar	
Tetrahymena	GGGGTT
Dictyostelium	$G_{1\text{-}8}A$
Bitki	
Arabidopsis	AGGGTTT
Memeli	
İnsan	AGGGTT

Tam Genom Dizileri

Moleküler biyolojideki en heyecan verici yeni gelişmelerden biri, hem insan genomu hem de *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* gibi birkaç model organizma ve farenin genomlarının tam nükleotid dizilerinin analiz sonuçları olmuştur (Tablo 4.5). Tüm genom dizilemenin sonuçları bizi tek, tek genlerin karakterizasyonuyla tüm genomların gen kapsamı ve organizasyonuna genel bir bakış açısına götürmüştür. Prensip olarak bu yaklaşım, bir organizmadaki tüm genleri tanımlama potansiyeline sahiptir ve genler böylece, yapı ve işlevleri konusunda incelemelere açık hale gelirler. Ancak ilginç olarak, tüm genom dizilemenin ürettiği çok yüksek miktardaki bilgiyi yorumlamakta yeni zorluklar oluşturmuştur ve biyoloji ile bilgisayar bilimi arasındaki bölgede yer alan ve insanlarınki gibi çok büyük genomları oluşturan milyarlarca bazın elde edilen diziliminden, faydalı biyolojik bilgilerin çıkarılması

TABLO 4.5 Dizilenen Genomların Özeti

Organizma	Genom büyüklüğü (Mb)[a]	Gen sayısı	Proteini kodlayan dizi
Bakteriler			
Mycoplasma genitalium	0.58	470	%88
H. influenzae	1.8	1743	%89
E. coli	4.6	4288	%88
Mayalar			
S. cerevisiae	12	6000	%70
S. pombe	12	4800	%60
Omurgasızlar			
C. elegans	97	19,000	%25
Drosophila	180	13,600	%13
Bitkiler			
Arabidopsis thaliana	125	26,000	%25
Pirinç	440	30,000–50,000	~%10
Memeliler			
İnsan	3200	30,000–40,000	%1–1.5

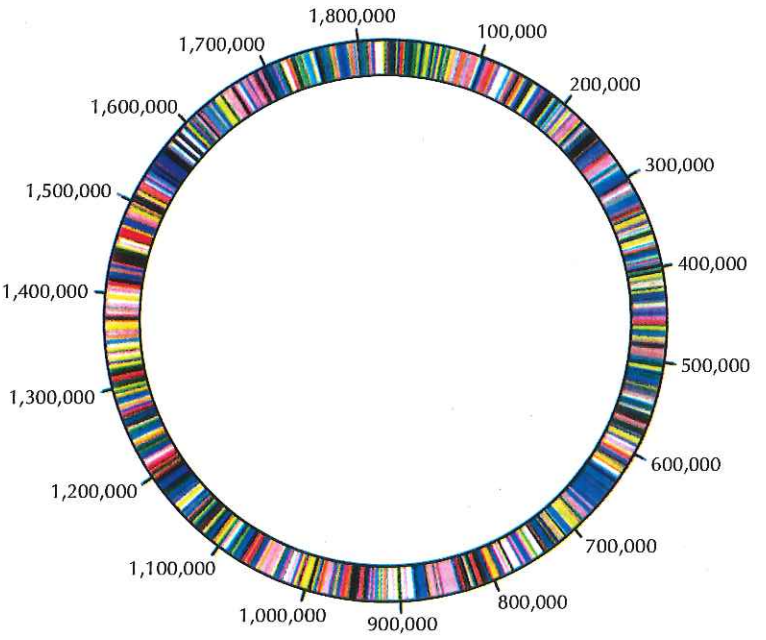
[a] Mb = milyon baz çifti.

ve analizi için gerekli hesaplama metodlarının geliştirilmesi üzerine odaklanan, **biyoinformatik** adı verilen yeni çalışma alanlarının gelişmesine yol açmıştır. Henüz öğrenilecek çok şey olmasına rağmen, şu anda mevcut olan genom dizileri bilim adamlarına tam gen setlerinin nükleotid dizilerinden oluşan eşsiz bir veri tabanı sağlamıştır. Bu genlerin çoğu daha önce tanımlanmadığından, işlevlerinin saptanması hücre biyolojisinde gelecekteki birçok çalışmanın temelini oluşturacaktır.

Prokaryot Genomları

Şu anda altmıştan fazla bakterinin tam genom dizilerini bilmekteyiz ve halen, daha da fazlasınınki saptanmakta. Craig Venter tarafından yönetilen bir araştırmacı ekibinin 1995 yılında bildirdiği ilk hücresel tam genom dizisi, *Haemophilus influenzae* adlı ve insan solunum yollarında sık görülen bir bakterininkiydi. *H. influenzae*'nin genomu yaklaşık 1.8 x 10^6 baz çifti uzunluğundadır (1.8 **megabaz** veya **Mb**), ve bu da, *E. coli* genomunun büyüklüğünün yarısından biraz azdır. Tam nükleotid dizisi *H. influenzae* genomunun 1,830,137 baz çifti içeren dairesel bir DNA molekülü olduğunu göstermiştir. Dizi daha sonra rRNA'lar, tRNA'lar ve proteinleri kodlayan genlerin tanımlanması için analiz edilmiştir. Muhtemel protein kodlayıcı bölgeler, DNA dizisinin **açık okuma çerçeveleri** yani, zincir sonlandıran üç kodondan (UAA, UAG ve UGA) hiçbirini kapsamadıklarından polipeptidleri kodlayabilen, uzun nükleotid dizi bölgelerini saptayan bilgisayarlı DNA dizisi analizleriyle tanımlanmıştır. Bu zincir sonlandıran kodonlar, her 21 kodonda bir rastgele bulunduğundan (toplam 64 adet içinde 3 olur kodonu) 100'den fazla kodon boyunca uzanan açık okuma çerçeveleri, genellikle işlevsel genleri simgeler.

Bu analiz, *H. influenzae* genomunda altı kopya rRNA geni, 54 farklı tRNA geni ve 1743 olası protein kodlayıcı bölge tanımlamıştır (Şekil 4.23). Bunların binden fazlasına, bilinen protein dizileri ile ilişkileri sayesinde, bir biyolojik rol öngörülebilmektedir (örn., sitrik asit döngüsünün bir enzimi), fakat diğerleri, işlevi bilinmeyen genleri



Şekil 4.23 *Haemophilus influenzae* genomu
Öngörülen protein kodlayan bölgeler renkli çubuklarla gösterilmiştir. Rakamlar DNA baz çifti sayısını simgeler. (R. D. Fleischmann et al., 1995 *Science* 269: 496.)

simgelemektedir. Öngörülen kodlama dizileri, ortalama olarak, yaklaşık 900 baz çifti uzunluğundadır yani, 1.6 Mb DNA'lık bir bölgeyi kaplarlar ve *H. influenzae* genomunun yaklaşık %90'ına karşılık gelirler.

Mycoplasma genitalium'un genomunun tam dizisi özellikle ilgi odağıdır, çünkü, mikoplazmalar en basit güncel bakterilerdir ve tüm bilinen hücreler arasında en küçük genoma sahiptirler. *M.genitalium* genomu sadece 580 kb (0.58 Mb) uzunluğundadır ve kendi başına çoğalan bir organizmayı idame ettirmek için gerekli, minimal gen setine sahiptir. DNA dizisinin analizi *M.genitalium*'un sadece 470, öngörülen protein kodlayan dizi bulundurduğunu gösterir ve bu da genomik DNA'nın yaklaşık %88'ini oluşturur. Bu dizilerin çoğu DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon, zar taşınımı ve enerji metabolizmasıyla ilgili proteinleri kodlayan genler olarak tanımlanmıştır. Ancak *M. genitalium, H. influenzae*'ya göre metabolik enzimler için çok daha az gen içerir, bu da, daha kısıtlı metabolizmasını simgeler. Örneğin, biyosentetik yolakların bileşenlerini kodladığı bilinen birçok gen, *M. genitalium*'un genomunda yoktur ve bu da amino asitlerin ve nükleotid öncüllerinin bir konakçı organizmadan elde edilmesi ihtiyacı ile tutarlıdır. İlginç olarak, mikoplazma genomu ayrıca, henüz işlevi bilinmeyen yaklaşık 150 gen kapsar. Yani en basit hücrelerde bile birçok genin biyolojik rolü henüz saptanmamıştır.

Arkebakteri *Methanococcus jannaschii*'nin 1996'da bildirilen genom dizisi arkebakteri, öbakteri ve ökaryotlar arasındaki evrimsel ilişkiler konusunda önemli bilgiler sağlamıştır. *M.jannaschii*'nin genomu 1.7 Mb büyüklüğündedir ve 1738 adet olası protein kodlama dizisi kapsar, yani, *H. influenzae* genomunun büyüklüğüne yakındır. Ancak, *M.jannaschii*'de tanımlanan protein kodlama dizilerinin sadece, yaklaşık üçte biri öbakteri veya ökaryotlardaki bilinen genlerle ilişkilidir ve bu da arkebakterilerin ayrı bir genetik yapıya sahip olduklarına işaret etmektedir. *M.jannaschii*'nin enerji üretimiyle ve hücre bileşenlerinin biyosentezi ile ilişkili proteinlerini kodlayan genleri öbakterilere benzer ve bu da temel metabolik işlemlerin hem arkebakteriler, hem de öbakteride ortak bir kökenden geldiğini

düşündürmektedir. Önemli olarak, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyonla ilişkili proteinleri kodlayan *M.jannaschii* genleri öbakteriden çok ökaryotlarla benzerdir. Bu arkebakterilerin genomik olarak dizilemesi böylece, arkebakteriler ve ökaryotların evrimsel olarak aynı kökenden geldiğini ve birbirlerine, her ikisinin öbakteri ile olan ilişkilerine göre, daha yakın olduklarını düşündürmüştür (bkz. Şekil 1.8).

E. coli'nin göreli sadeliği ve genetik yapısının basitliği onu, moleküler biyologların çok tercih ettiği bir organizma haline getirse de, 4.6 Mb büyüklüğündeki *E. coli* genomu 1997'ye kadar tam olarak dizilenememiştir. *E. coli* dizisinin analizi, toplam 4288 gen göstermiştir ve protein kodlayan diziler, *E. coli* genomunun %88'ini oluşturur. Dizileme ile ortaya çıkan 4288 genden 1835'i, daha önceden tanımlanmıştır ve ayrıca 821'inin işlevleri, başka organizmaların karakterize edilmiş genlerinin dizileri ile karşılaştırmalar sayesinde çıkartılabilmiştir. Ancak, 1632 *E. coli* geninin (genomun nerdeyse %40'ı) işlevi belirlenememiştir. Böylece *E. coli* kadar geniş şekilde çalışılmış bir organizma için bile, genomik dizileme, prokaryot hücre biyolojisi hakkında öğreneceğimiz çok şey olduğunu göstermektedir.

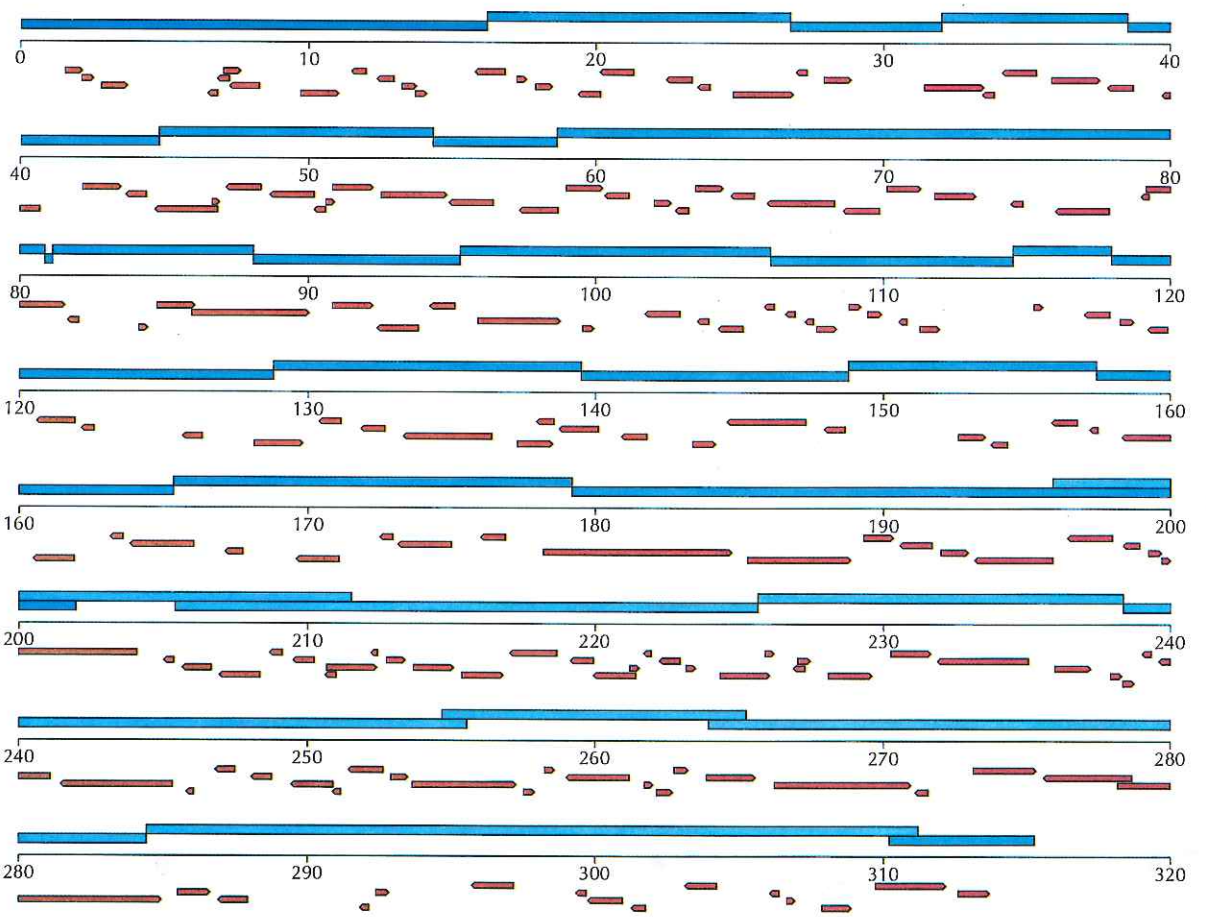
Maya Genomu

Önceden belirtildiği gibi, en basit ökaryot genom *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunur ($1.2x10^7$ DNA baz çifti). Ayrıca mayalar hızlı çoğalırlar ve basit genetik yararlanımlara açıktırlar. Böylece, birçok yönden mayalar memeli veya diğer yüksek ökaryotların hücrelerine göre çok daha kolayca çalışılabilen model ökaryot hücrelerdir. Bu nedenle, bir maya kromozomunun tümünün 1992'de dizilenmesi (Şekil 4.24) ve sonrasında, 1996'da tüm maya genomunun dizilenmesi, ökaryotik hücrelerin moleküler biyolojisinin anlaşılmasında önemli adımlar olmuştur.

S. cerevisiae genomunda 6000 gen vardır ve bunun içinde 5885 protein kodladığı öngörülen dizi, 140 ribosomal RNA geni, 275 transfer RNA geni ve 40 adet RNA işleme ile ilişkili (Bölüm 6'da tartışılmaktadır) küçük nükleer RNA'ları kodlayan gen bulunur. Mayalar böylece, bakteriyel genomlar gibi yüksek oranda protein kodlayıcı diziye sahiptirler ve protein kodlayan diziler toplam maya DNA'sının yaklaşık %70'ini oluşturur. Bununla uyumlu şekilde, maya genlerinin sadece %4'ünün intron kapsadığı saptanmıştır. Dahası, intron kapsayan *S. cerevisiae* genleri de genellikle sadece genin başlangıcına yakın küçük bir intron bulundururlar.

Bilgisayar analizi *S. cerevisiae*'nın protein kodlama dizilerinden yaklaşık 3000'i için, bilinen genlerin dizilerine benzerlikten hareket edilerek bir işlev öngörebilmiştir. Bu genlerin analizine dayanılarak maya proteinlerinin yaklaşık %11'inin metabolizmayla, %3'ünün metabolik enerjinin üretimi ve depolanmasıyla, %3'ünün DNA replikasyonu, onarımı ve rekombinasyonuyla, %7'sinin transkripsiyonla, %6'sının proteine çevrimle ve %14'ünün protein sınıflanması ve taşınmasıyla ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Yine de, bu genlerin çoğunun işlevi ancak genel olarak bilinmektedir ("transkripsiyon faktörü" gibi) yani, hücre içindeki kesin rolleri halen tanımlanmayı beklemektedir. Ayrıca maya genomunun kodladığı proteinlerin yarısı, daha önceden tanımlanan genlerle ilişkili olmadığından, 3000 adet daha bilinmeyen proteinin işlevinin genetik ve biyokimyasal analizlerle aydınlatılması gerekmektedir.

S. cerevisiae genomunun dizinlenmesi, daha yakın zamanda bölünen maya *S. pombe*'nin genomunun dizilenmesi takip etmiştir. Bu bölümde daha önce tartışıldığı gibi *S. cerevisiae* ve *S. pombe*



Şekil 4.24 Maya kromozomu III
Üst mavi çubuklar DNA dizilemek için kullanılan klonları simgeler. Açık okuma çerçeveleri okla gösterilmiştir. (S. G. Oliver et al., 1992 *Nature* 357: 38.)

birbirinden oldukça farklıdır ve sentromerlerinin yapısı dahil, biyolojilerinin birçok yönü ile birbirlerinden ayrılırlar (bkz. Şekil 4.21).

İlginç olarak, genomları da çok büyük farklılıklar gösterir. Hem *S. cerevisiae* hem *S. pombe*, yaklaşık aynı miktarda, tek DNA dizisi kapsasa da (12.5 Mb), *S. pombe*'de sadece 4,800 gen vardır. İntronlar *S. pombe*'de, *S. cerevisiae*'ye göre daha sık görülürler. *S. pombe* genlerinin yaklaşık %43'ünde intronlar vardır ve *S. pombe*'deki intronlar *S. cerevisiae*'dakilerdan çok daha büyüktür; bu nedenle protein kodlayan diziler, *S. pombe* genomunun sadece yaklaşık %60'ını oluştururlar. *S. pombe* genlerinin büyük kısmının, *S. cerevisiae* genomunda homologları vardır ama yaklaşık 700 gen *S. pombe*'ye özgüdür.

Maya genomu dizileri artık tamamlandığından, *S. cerevisiae* ve *S. pombe*'de tanımlanan birçok yeni genin işlevlerinin belirlenmesi önemli bir hedeftir. Neyse ki, mayalar bilinmeyen genlerin işlevsel analizine çok açıktır, çünkü, normal kromozomal lokuslar, klonlanmış dizilerle homolog rekombinasyon sayesinde kolayca inaktive edilebilir (bkz. Şekil 3.39). Bu nedenle, başlangıçta sadece nükleotid dizileri temelinde tanımlanmış olan maya genlerinin, direkt işlevsel analizi sistematik olarak gerçekleştirilebilir. Maya genlerinin dizilenmesi böylece basit ökaryot hücre biyolojisinin birçok yeni alanının çalışılmasına kapı açmıştır. Bu tip çalışmaların mayalarla kısıtlı olmayıp, insanlar dahil tüm ökaryotlarda paylaşılan yeni genlerin işlevlerini açığa çıkarması beklenmektedir.

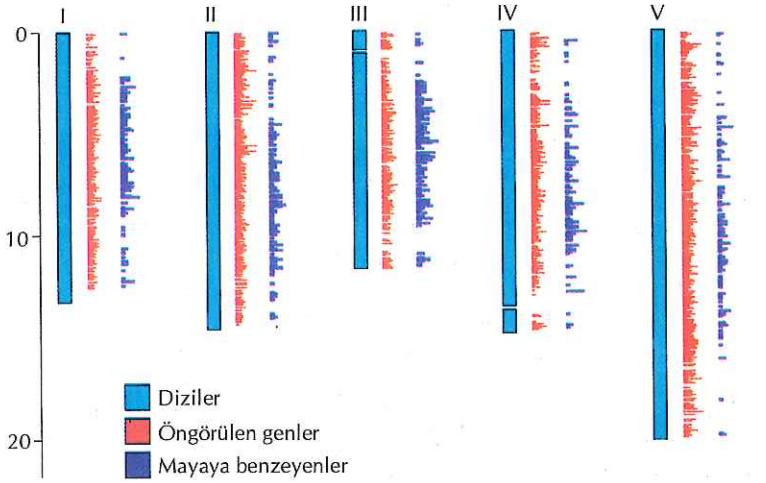
Caenorhabditis elegans ve Drosophila melanogaster Genomları

C. elegans ve *Drosophila* genomları nispeten basit hayvan genomlarıdır, büyüklük ve karmaşıklık açısından mayalar ve insanlar arasında yer alırlar. Bu organizmaların her birinin kendine özgü özellikleri, onları genom analizi için önemli modeller haline getirir: *C. elegans* hayvan gelişimi çalışmaları için sıklıkla kullanılır, *Drosophila* ise genetik açıdan, özellikle kapsamlı olarak incelenmiştir. Ancak, bu organizmaların genomları, mayaların yaklaşık on katı büyüktür ve bu da genom haritalaması ve dizileme açısından yeni zorluklar oluşturur. *C. elegans*'ın dizisinin 1998'de belirlenmesi, böylece, genom analizinde önemli bir temel nokta oluşturmuştur ve genom dizilemeyi tek hücreli organizmalardan (bakteri ve maya), hayvan gelişiminde önemli bir model olarak tanınan, çok hücreli bir organizmaya genişletmiştir.

C. elegans genomunun analizinin ilk aşamalarında yaklaşık 40 kb büyüklüğünde DNA ekleri (insert) bulunduran kozmidlerde klonlanmış DNA fragmanları kullanmıştır (bkz. Tablo 3.3). Ancak bu yaklaşım, tüm genomu kapsayamamış ve sonunda maya yapay kromozomu (YAC) vektörlerinde çok daha büyük DNA parçalarının klonlanmasıyla başarı sağlanmıştır. Bölüm 3'de belirtildiği gibi, YAC'ların kendilerine özgü özellikleri, sentromerler ve telomerler içermeleri ve böylece mayalardaki doğrusal kromozomlara benzer şekilde moleküler olarak replike olabilmeleridir. Bu nedenle, binlerce kilobaz büyüklüğünde maya kromozomal DNA'ların boyutundaki DNA fragmanlarının klonlanmasında kullanılabilirler. YAC'larda ve diğer yüksek kapasiteli vektörlerde klonlanabilen büyük DNA ekleri, karmaşık genomların analizlerinde çok büyük önem taşır.

C. elegans genomu 97 x 10^6 baz çifti büyüklüğünde olup yaklaşık 19,000 protein kodladığı öngörülen dizi içerir ve bu da mayadaki gen sayısının yaklaşık üç katıdır (Şekil 4.25). Mayanın kompakt genom organizasyonunun tersine, *C. elegans*'daki genler yaklaşık 5 kilobaz boyunca yayılır ve ortalama beş intron kapsar. Böylece protein kodlama dizileri, *C. elegans* genomunun sadece %25'ini oluştururken, *S.pombe* ve *S.cerevisiae*'da %60-70 ve bakteri genomlarında neredeyse %90'ını oluşturur.

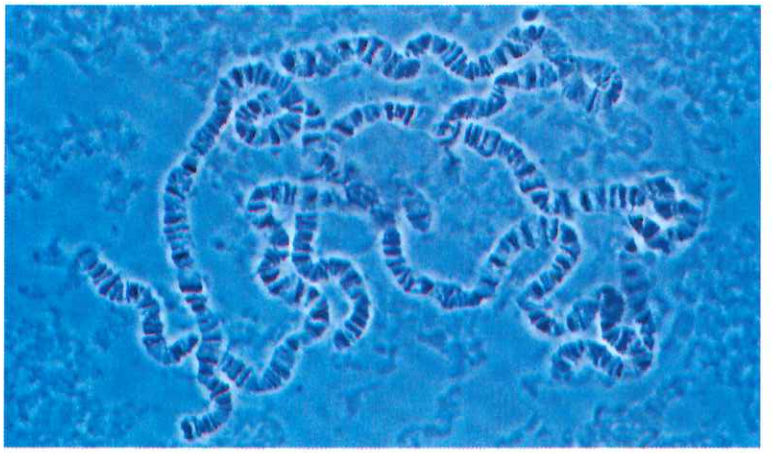
Öngörülen *C. elegans* proteinlerinin yaklaşık %40'ı diğer organizmaların bilinen proteinlerine belirgin şekilde benzerlik göstermiştir. Beklendiği üzere *C. elegans* ve insanların proteinleri



Şekil 4.25 *C. elegans* genomu
C. elegans'ın öngörülen genlerinin her kromozomdaki pozisyonları kırmızı çubuklarla gösterilmiştir. Maya genine benzer olanlar morla işaretlenmiştir. (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. *Science* 282:2012.)

arasında, *C. elegans* ile maya veya bakterinin proteinleri arasındakine göre çok daha fazla benzerlik vardır. *C. elegans* ve maya arasında ortak olan proteinler bu hücreler tarafından paylaşılan metabolizma, DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon ve protein trafiği gibi temel hücresel işlemlerde işlevler görebilirler. Bu biyolojik temel işlemler, her iki organizmada benzer sayıda gen tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu genlerin ökaryot hücreleri tarafından paylaşılıyor olması olasıdır. Aksine, *C. elegans* genlerinin çoğunluğu mayada bulunmaz ve çok hücreli organizmaların gelişmesi için gerekli daha karmaşık düzenleyici aktivitelerde işlev görebilirler. Bu genlerin işlevlerinin aydınlatılması, hayvan gelişiminin anlaşılması açısından özellikle heyecan vericidir. Yetişkin *C. elegans*'ın tüm vücudunda sadece 959 somatik hücre bulunmasına karşın, bunların hepsinde, daha karmaşık hayvanlarda bulunan özelleşmiş hücre tipleri mevcuttur. Ayrıca *C. elegans* gelişimini sağlayan hücre bölünmelerinin tam paterni, yetişkin hayvandaki 302 nöronun tümünün bağlantılarının analizi dahil, tanımlanmıştır. *C. elegans* gelişimi ve farklılaşmasıyla ilişkili olan genlerin çoğunun, memeli hücrelerinde çoğalma ve farklılaşmayı kontrol eden genlerle ilgili oldukları gösterilmiştir ve bu da, *C. elegans*'ın, daha karmaşık hayvanlar için bir model olarak seçilmesinin uygunluğunu doğrular. *C. elegans*'ın genomik dizisinin çalışılmasının, daha birçok kritik gelişimsel kontrol genini ortaya çıkaracağı hemen hemen kesindir.

Drosophila, hayvan gelişimi için bir başka temel modeldir ve genetik olarak özellikle iyi karakterize edilmiştir. *Drosophila*'nın genetik analiz için avantajları, nispeten basit genomu ve bakımının ve üretilmesinin laboratuvarda kolayca yapılabilmesidir. Ayrıca, *Drosophila*'da, genetik analiz için özel bir araç, larvaların tükrük bezleri gibi bazı dokularda bulunan, dev **politen kromozomlarıdır**. Bu kromozomlar bölünmeyen hücrelerde, birbirinden ayrılamayan DNA ipliklerinin, tekrarlanan replikasyonu sonucunda ortaya çıkarlar. Böylece, her politen kromozomda, paralel olarak dizilmiş yüzlerce, birbirinin aynı DNA molekülü mevcuttur. Büyüklükleri nedeniyle politen kromozomları, ışık mikroskobunda görülebilirler ve uygun boyama işlemleri belirgin bir bant paterni ortaya çıkarır (Şekil 4.26). Politen kromozomlarının bantları, metafaz kromozomlarıyla elde edilenden çok daha yüksek bir çözünürlük sağlar (örn., bkz. Şekil 4.17). Politen kromozomlar, aktif olarak ifade edilen genleri; kapsayan, yoğunlaşmamış interfaz kromozomlarıdır. Bu



Şekil 4.26 *Drosophila*'nın politen kromozomları
Boyanmış tükrük bezi kromozomlarının ışık mikroskop görüntüsü. Dört kromozom (X, 2, 3 ve 4) sentromerlerinden birleşmiştir. (Peter J. Bryant / Biological Photo Service.)

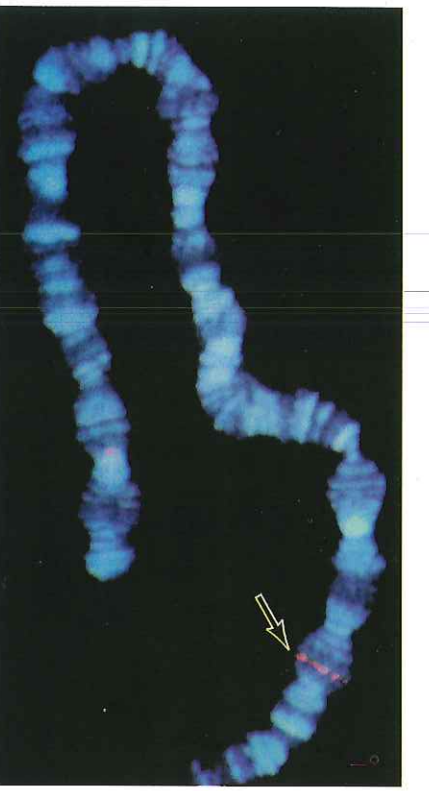
kromozomlarda 5000'den fazla bant görülebilir ve her biri ortalama olarak, yaklaşık 20 kb DNA'ya karşılık gelir. Aksine, insan metafaz kromozomlarında tanımlanan bantlar birkaç megabaz DNA içerir.

Politen kromozomların bant paterni böylece *Drosophila* genomunun yüksek çözünürlüklü bir fiziksel haritasını sağlar. Gen delesyonları sıklıkla spesifik bir kromozomal bandın kaybıyla ilişkilendirilebilir ve bu şekilde bir genin kromozomdaki fiziksel yerini tanımlar. Ayrıca, klonlanmış DNA'lar *in situ* hibridizasyonla politen kromozomlara haritalanabilir ve bu sıklıkla klonlanmış genleri spesifik bantlara lokalize etmeye yetecek çözünürlükte olur (Şekil 4.27). Böylece, kozmid veya YAC klonlarının (bunlar birçok bant boyunca kopyalanacak büyüklüktedir) pozisyonları kolayca haritalanabilir ve bu da genomik dizi analizi için bir temel oluşturur.

Drosophila genetiğinin önemi nedeniyle, 2000'li yılların başında *Drosophila* genomunun dizilenmesi genomik analiz için önemli bir gelişme sağlanmıştır. *Drosophila*'nın genomu, yaklaşık üçte biri heterokromatin olan yaklaşık 180 x 10^6 baz çiftinden oluşur. Heterokromatin temel olarak basit dizili satellit tekrarlardan oluşur ve ayrıca dağılmış yer değiştirebilen elemanlar bulunur ve bunlar genomik diziye dahil değildir. Kalan 120 x 10^6 baz çifti gibi kromatin kısmı büyük DNA ekleri taşıyan **bakteri yapay kromozomu (BAC)** ve küçük DNA fragmanlarının plazmid vektörlerinde rastgele olarak klonlandığı ve dizilendiği tek vuruş (shotgun) yaklaşımı kombinasyonuyla dizilenmiştir. Daha sonra bu küçük DNA fragmanlarının dizileri fragmanları arasındaki çakışmaların tanımlanmasıyla birbirini takip eden büyük bir dizi haline getirilmiştir ve bu dizi oluşumları *Drosophila* genomunun ökromatin kısmının tam bir dizisini elde edecek şekilde BAC klonları ile eşleştirilmiştir.

Drosophila genomunda yaklaşık 13,600 gen vardır ve bu *C. elegans*'daki gen sayısından biraz daha azdır. *C. elegans* gibi *Drosophila* genlerinde de ortalama dört intron vardır ve intron dizilerinin toplam miktarı ekson dizilerine benzerdir. Toplam olarak protein kodlayan diziler *Drosophila* genomunun yaklaşık %13'ünü oluşturur. *Drosophila*'da *C. elegans*'dan daha az gen olsa da birçok genin iki organizmada da bulunması önemlidir. Bu duplikasyonlar dikkate alındığında, farklı gen sayısı *Drosophila* ve *C. elegans*'da benzerdir ve 8000 ile 9000 arasındadır. *Drosophila* genlerinin yaklaşık %20'si hem maya hem *C. elegans*'da bulunan genlerdir - bu genlerin kodladığı proteinler tüm ökaryot hücrelerde bulunan işlemleri yapıyor olabilir. Diğer *Drosophila* genleri *C. elegans*'da bulunan ama mayada bulunmayan genlerdir ve bu genler de sadece *Drosophila*'da bulunurlar.

Drosophila gibi karmaşık bir hayvanın çok daha basit bir organizma gibi görülen mayadaki gen sayısının sadece iki katı kadar özgün gene sahip olması çok ilginçtir. Öyle görünmektedir ki, çok hücreli organizmaların karmaşıklığı daha fazla sayıdaki gene bağlı değildir. *Drosophila* ve *C. elegans*'ın biyolojik karmaşıklığı kısmen proteinlerinin mayaya göre daha büyük olması ve daha fazla işlevsel domain içermelerinden kaynaklanabilir. *Drosophila* ve *C. elegans* genomlarının dizilenmesiyle ortaya çıkarılan genlerin üzerinde daha ileri çalışmalar ve işlevsel analiz şüphesiz bu genlerin hayvan gelişmesinin karmaşık işlemlerini yönlendirme şekillerini anlamamızda çok büyük bir rol oynayacaktır.



Şekil 4.27 Bir Drosophila politen kromozomuna *in situ* hibridizasyon
Bir YAC klonunun politen kromozoma hibridizasyonu gösterilmektedir. Hibridizasyon bölgesi okla işaretlenmiştir. (Daniel L. Hartl, Harvard University.)

Bitki Genomları

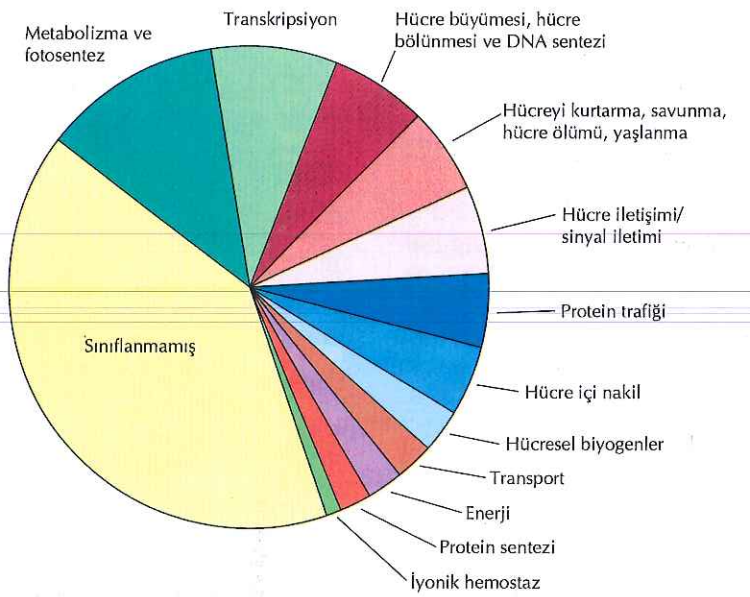
2000 yılında *Arabidopsis thaliana*'nın genom dizisinin tamamlanması, genom dizilemeyi hayvanlardan bitkilere genişletmiş ve böylece bitki biyolojisi için çok önemli bir olay olmuştur. *Arabidopsis thaliana* basit bir çiçekli bitkidir ve bitki moleküler biyolojisi ve gelişimi çalışmaları için yaygın şekilde bir model olarak kullanılmıştır. Moleküler biyoloji ve genetikte model organizma olarak avantajları yaklaşık 125 x 10^6 çiftlik küçük boyutlu genomudur ve bu da büyüklük olarak *C. elegans* ve *Drosophila* genomlarına benzerdir. *Drosophila* genomunda olduğu gibi *Arabidopsis* genomu temel olarak büyük DNA ekleri (insert) taşıyabilen BAC vektörleri kullanılarak dizilenmiştir.

İlginçtir ki *Arabidopsis* genomunun analizi yaklaşık 26,000 protein kodlayan gen kapsadığını göstermiştir ve bu da *C. elegans* veya *Drosophila*'da bulunan genlerden çok daha fazladır. Ancak, bu beklenmedik derecede fazla sayıda gen *Arabidopsis* genomunun kodladığı proteinlerde daha fazla bir çeşitliliği yansıtmaz. Bunun yerine *Arabidopsis*'teki çok sayıda genin, *Arabidopsis* genomunun büyük parçalarının duplikasyonu sonucu oluştuğu görünmektedir. Bu duplikasyonlar genomun yaklaşık %60'ıyla ilgilidir yani, *Arabidopsis*'te birbirinden ayrı protein kodlayan gen sayısının yaklaşık 15,000 yani *C. elegans* veya *Drosophila*'daki gen sayısına benzer olduğu tahmin edilmektedir.

Arabidopsis'teki gen yoğunluğu da *C. elegans*'dakine benzer ve protein kodlayan diziler *Arabidopsis* genomunun yaklaşık %25'ini oluşturur. Ortalama olarak *Arabidopsis* genlerinde yaklaşık 4 intron vardır ve intron dizilerinin toplam uzunluğu ekson dizilerinin toplam uzunluğuyla aynı gibidir. Yer değiştirebilen elemanlar *Arabidopsis* genomunun yaklaşık %10'unu oluşturur. *Drosophila*'da olduğu gibi yer değiştirebilen unsur tekrarları sentromerlerde uydu tekrarlanan dizilerle birlikte toplanmışlardır.

Arabidopsis genlerinin işlevlerinin karşılaştırmalı analizi bitkilerle hayvanların genleri arasında ilginç benzerlikler ve farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. DNA replikasyonu, tamir, transkripsiyon, translasyon ve protein trafiği gibi temel hücresel işlemlerle ilişkili *Arabidopsis* genleri maya, *C. elegans* ve *Drosophila*'da benzerdir ve bu da tüm ökaryot hücrelerin ortak evrimsel kökenini yansıtır. Aksine hücre sinyalleri veya zardan taşıma gibi işlemlerle ilgili proteinleri kodlayan *Arabidopsis* genleri hayvanlardakinden oldukça farklıdır ve bu da bitkiler ve hayvanlar arasında fizyoloji ve gelişim bakımından büyük farklılıklarla tutarlıdır. *Arabidopsis* genlerinin yaklaşık üçte biri mayada ve hayvan genomlarında bulunmaz ve sadece bitkilere özgü gibidir. *Arabidopsis* genlerinin genomun %22'sini oluşturan en büyük işlevsel grubu metabolizma ve fotosentezle ilişkili proteinleri kodlar (Şekil 4.28). Başka büyük bir gen grubu (genomun %12'si) bitki savunmasıyla ilişkili proteinleri kodlar. Ayrıca *Arabidopsis*'in transkripsiyonu düzenleyen 3000'den fazla protein kodlaması (genomun %17'sini oluşturur) ilginçtir. Bu gen düzenleyici protein (transkripsiyon faktörleri) sayısı *Drosophila*'da bulunanın iki katı, *C. elegans*'ta bulunanın üç katı fazladır. *Arabidopsis* transkripsiyon faktörlerinin çoğu bitkilere özgüdür ve bu da muhtemelen hayvan gelişiminde ve hayvanların çevreye verdikleri cevaplarda, gen ekspresyonunun kendine özgü özelliklerini yansıtır.

Arabidopsis'in 2002 yılında dizilenmesini pirinç genomunun iki taslak dizisinin yayınlanması takip etmiştir. Pirinç bir tahıl ürünü olarak çok önemlidir ve dünya nüfusunun yarısından çoğu için temel



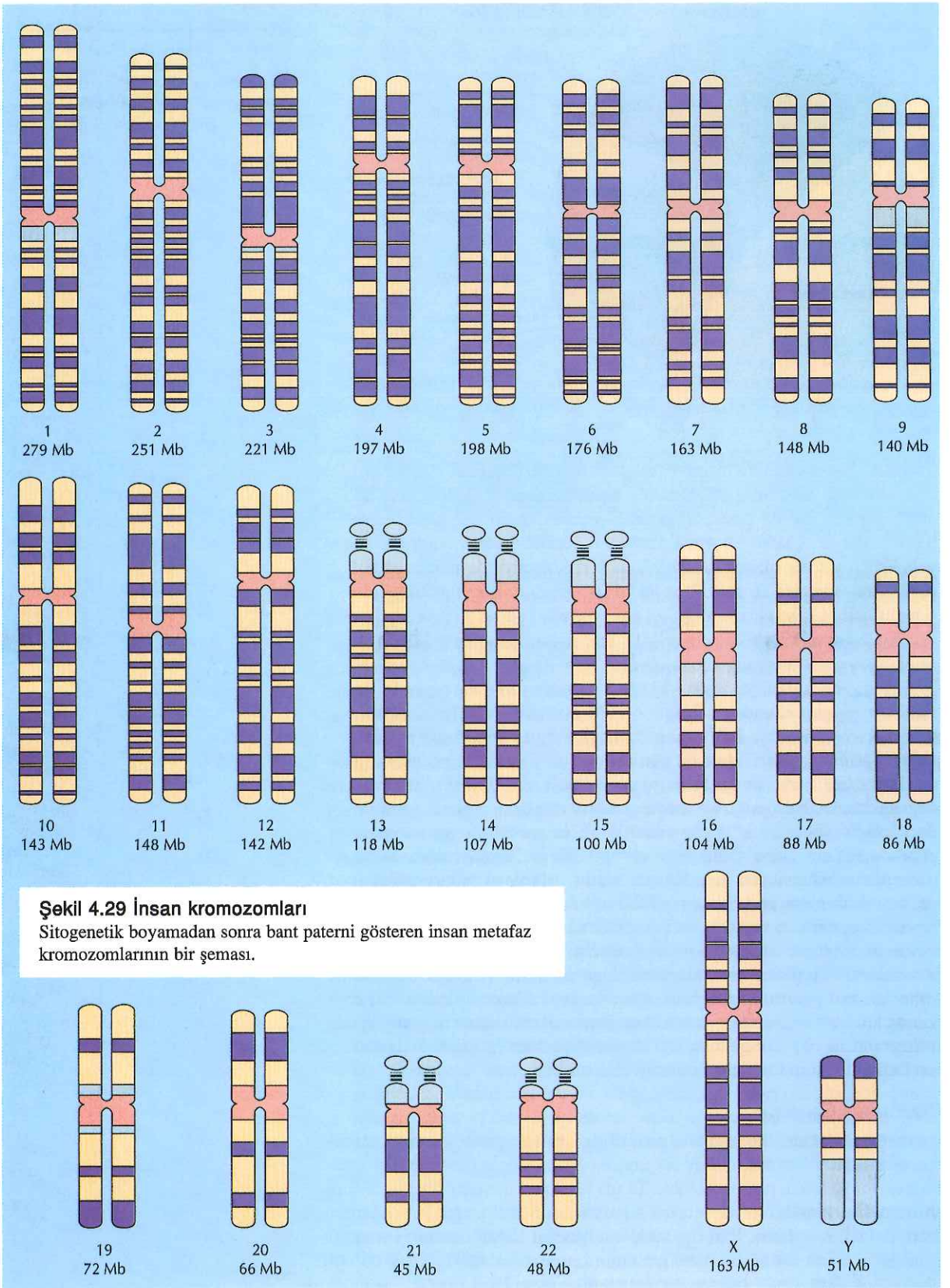
Şekil 4.28 *Arabidopsis thaliana*'nın öngörülen genlerinin işlevleri
Şema *Arabidopsis*'in genlerinin farklı işlevsel kategorilerde oranını göstermektedir. (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000. *Nature* 408:796.)

gıdadır. Bu nedenle pirinç genomunun dizilenmesi tarım ve biyoteknoloji alanında çok önemli uygulamalara yol açabilir. İki araştırmacı grubu iki pirinç alt türünün genomlarının taslak dizilerini bildirmişlerdir: Çin'de ve Asya'nın büyük kısmında en yaygın olarak yetiştirilen alt tür olarak *indica* alt türü ve Japonya'da tercih edilen çeşit olan *japonica* alt türü. Her iki pirinç genomu dizisi günümüzde tamamlanmış taslaklar halinde olmalarına ve dizilerde halen doldurulması gereken birçok boşluk bulunmasına rağmen bize çok miktarda yararlı bilgi sağlamaktadırlar.

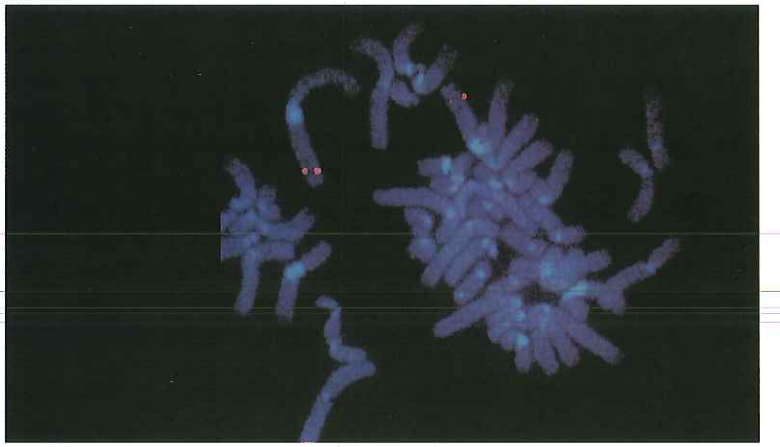
Pirinç genomunda yaklaşık 440 x 10^6 baz çifti DNA vardır ve bu da *Arabidopsis* genomundan yaklaşık 4 kat büyüktür. Pirinç genomunun yaklaşık %45'i hem basit dizi tekrarları hem yer değiştirebilen elemanlar dahil tekrarlanan dizilerden oluşur. Taslak pirinç genomu dizilerindeki gen sayısı tahminleri 32,000 ile 50,000 arasında değişmektedir. Bu tahminler araştırma grubuna göre değişir ve daha ileri analiz ile gözden geçireceklerdir. Yine de pirinç genomunda *Arabidopsis*'ten daha fazla gen var gibidir ve muhtemelen insan genomunda bulunandan da fazla gen vardır. *Arabidopsis* gibi pirinçte de birçok duplike gen bulunur (%70'ten fazla) ve bunlar genomun büyük parçalarının replikasyonu sonucunda oluşmuş olabilir. İlginç olarak *Arabidopsis*'de tanımlanmış genlerin %80'i pirinçte de bulunur. *Arabidopsis* ve pirinç arasında ortak olan genlerin bir çoğu mayada veya hayvan genomlarında bulunmaz ve bu nedenle bitkilere özgü gibidirler. Ayrıca, birçok öngörülen genin *Arabidopsis*'te karşılığı yoktur ancak bu "öngörülen" genlerin gerçekten protein kodlayıp kodlamadığı henüz bilinmemektedir. Halen birçok soru mevcut olsa da pirinç genomu dizisinin tamamlanması ve devam eden analizi hem bitki biyolojisini anlamamıza hem de dünyada açlığa karşı savaşa yardımcı olacak ve tahıl üretiminde iyiye gitmeye katkıda bulunacaktır.

İnsan Genomu

Birçok bilim adamı için, genom analizinin nihai amacı insan genomunun tam nükleotid dizisinin tanımlanmasıdır: yaklaşık 3 x 10^9 DNA baz çifti. Bu gelişmenin büyüklüğünü anlamak için, insan genomunun *Drosophila*'dan yaklaşık 10 kat büyük olduğunu, en



Şekil 4.29 İnsan kromozomları
Sitogenetik boyamadan sonra bant paterni gösteren insan metafaz kromozomlarının bir şeması.

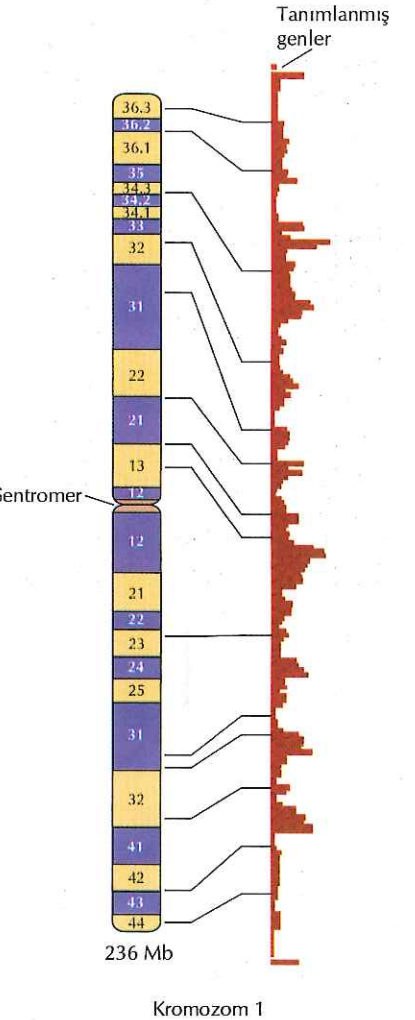


Şekil 4.30 Floresan *in situ* hibridizasyon
Boyanmış insan metafaz kromozomları (mavi) lamin B reseptörünü kodlayan gen için bir floresan prob ile hibridize edilmiştir. Tek gen hibridizasyon sinyalleri kırmızı floresans olarak görülür. (K. L. Wydner ve J. B. Lawrence, University of Massachusetts Medical Center.)

küçük insan kromozomunun bile tüm maya genomundan birkaç kat büyük olduğunu ve insan genomunu oluşturan DNA'nın açılmış uzunluğunun 1 m olduğunu hatırlayın. Tüm bu açılardan bakıldığında, insan genomunun dizisinin saptanması çok büyük bir plandı ve 2001'de taslak halinde yayımlanması tarihi bir bilimsel olay olarak kabul edilmiştir.

İnsan genomu her biri 45 ila 280 Mb DNA kapsayan 24 kromozoma dağılmıştır (22 otozom ve 2 cinsiyet kromozomu) (Şekil 4.29). Genom dizisinin tanımlanmasından önce birkaç bin insan geni tanımlanmıştı ve insan kromozomundaki yerlerine haritalanmıştı. Genlerin yerleşimlerini belirlemek için sık kullanılan yöntemlerden biri floresan boyalarla etiketlenmiş boyaların probların kromozomlara *in situ* hibridizasyonudur - bu metoda genel olarak **floresan *in situ* hibridizasyon veya FISH** adı verilir (Şekil 4.30). Metafaz kromozomlarına *in situ* hibridizasyonu klonlanmış genin bir kromozom bandı ile tanımlanmış bir lokusa haritalanmasını sağlar. İnsan metafaz kromozomlarının her bandında binlerce kilobaz DNA bulunduğundan insan metafaz kromozomuna *in situ* hibridizasyon, *Drosophila*'da politen kromozomlara hibridizasyonun sadece 10 ila 20 kb DNA kapsayan interfaz kromozom bantlarına genlerin lokalizasyonunu sağladığı şekilde ayrıntılı bir haritalama bilgisi sağlamaz. Ancak, prometafaz veya interfaz hücrelerinden daha fazla uzatılmış insan kromozomlarına hibridizasyon ile, yaklaşık 100 kb'lik klonlanmış gen bölgelerinin haritalanmasını sağlayacak şekilde floresans *in situ* hibridizasyon kullanımıyla daha yüksek çözünürlük elde edebilir. FISH dışında insan genomunun fiziksel genetik haritalarını çıkarmak için genetik bağlantı analizi ve klonlanmış genomik ve cDNA dizilerinin fiziksel haritalaması da kullanılmıştır. 1996'ya kadar insan kromozomlarına yaklaşık 30,000 gene karşılık gelen belirleyici (marker) haritalanmıştı ve bu da genomik dizileme için bir temel oluşturdu (Şekil 4.31).

2001'de yayımlanan insan genomunun taslak dizileri farklı yaklaşımlar kullanılan iki bağımsız araştırmacı grubu tarafından elde edilmişti. Bu araştırma takımlarından biri olan Uluslararası İnsan Genomu Dizileme Konsorsiyumu, dizileme için insan kromozomunda bölgelere haritalanmış olan BAC klonları kullandı. Celera Genomik'ten Craig Venter tarafından yönetilen diğer grup ise, küçük fragmanların klonlandığı ve genomun dizisini oluşturmak için bu fragmanların dizileri arasında birbirini takip eden bölgelerin



Şekil 4.31 İnsan kromozom 1'inin transkript haritası
İnsan kromozom 1'inin cDNA klonlarının temsili bir haritası verilmektedir. Sağdaki histogram kromozom boyunca genlerin dağılımını simgeler. (Genome Maps 7, 1996. *Science* 274:547.)

ANAHTAR DENEY

İnsan Genomu

Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome
International Human Genome Sequencing Consortium
Nature, Volume 409, 2001, pages 860-921

The Sequence of the Human Genome
J.Craig Venter and 273 others
Science, Volume 291, 2001, pages 1304-1351

Bağlam

İnsan genomunun tümünü dizileme fikri ilk olarak 1980'li yılların ortalarında ortaya atıldı. Bu fikir önce bunun gerçekten mümkün olmayacağını düşünen biyologlar tarafından şüpheyle karşılandı. O zamanlarda tümüyle dizilenen en büyük genom yaklaşık toplam 180,000 baz çifti DNA'dan oluşan Epstein-Barr virusüydü. Bu perspektiften bakıldığında yaklaşık 20,000 kat büyük olan insan genomunun dizilenmesi birçok kişi için imkansız görünüyordu. Ancak biyolojide bu kadar büyük bir proje başkalarının da ilgisini çekti ve bunlar arasında o zamanlar Enerji Bakanlığında Sağlık ve Çevre Araştırmaları Bürosunun başkanı olan Charles DeLisi vardı. 1986'da DeLisi insan genomu girişimini Enerji Bakanlığı içinde bir proje olarak başlatmayı başardı.

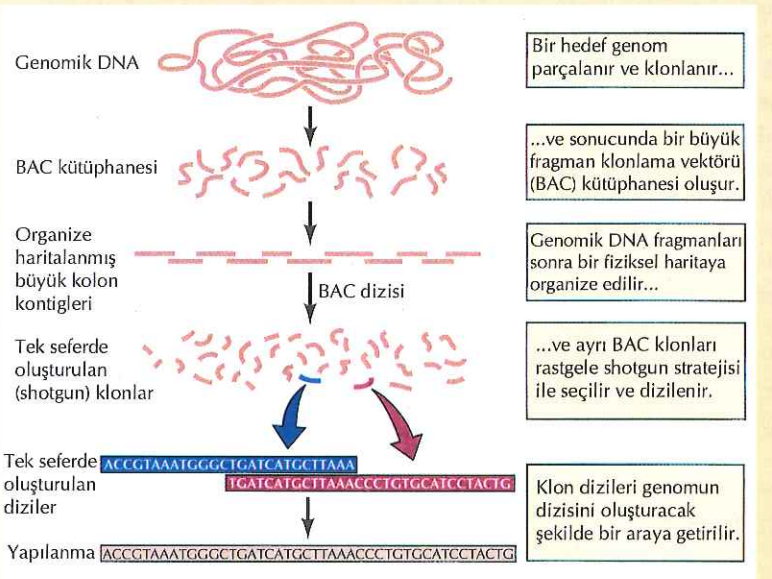
Proje 1988'de Ulusal Araştırma Konseyi'nin bir komitesi tarafından desteklenmesiyle daha fazla destek buldu. Bu komite birkaç model organizmanın genomunun dizilenmesi ve insan kromozomlarının detaylı genetik ve fiziksel haritalarının paralel olarak geliştirilmesi dahil daha geniş bir açılım önerdi. Bu çaba ilk zamanlarda James Watson'ın (DNA'nın yapısını bulanlardan) ve daha sonra da Frances Collins'in yönetimi altında National Institutes of Health'i merkez aldı.

Dizilenen ilk tam genom *Haemophilus influenzae* bakterisiydi ve 1995'te Craig Venter ve arkadaşları tarafından bildirildi. Venter National Institutes of Health'de genom dizileme projesinin bir parçasıydı ama 1991 yılında kar amacı gütmeyen bir şirket olan Institute for Genomic Research'ü yönetmek üzere ayrılmıştı. Bu arada insan genomunun haritalanmasında büyük bir ilerleme olmuştu ve *H. influenzae* dizisini diğer bakteriler, mayalar ve 1998'de *C. elegans*'ın dizileri takip etti.

1998'de Venter, Celera Genomics adlı yeni bir şirket kurdu ve tüm insan genomu dizisini üç yıl içinde elde edecek şekilde gelişmiş dizileme teknolojileri kullanma planlarını duyurdu. Buna Collins ve diğer devlet tarafından desteklenen genom projesi liderleri çabalarını arttırarak cevap verdiler ve bu durum sonunda Şubat 2001'de insan genomunun iki taslak dizisinin yayımlanmasıyla sonuçlandı.

Deneyler

İki bilim adamı grubu insan genomu dizisini elde etmek için farklı yaklaşımlar kullandı. Kaynağı devlet tarafından sağlanan Uluslararası İnsan Genomu Dizileme Konsorsiyumu Eric Lander tarafından yönetiliyordu ve daha önce insan kromozomlarına haritalanmış BAC klonlarından elde edilen DNA fragmanlarını diziledi ve bu maya ve *C. elegans* genomlarının dizilerini tanımlamak için kullanılan yaklaşıma benzerdi (bakınız Şekil). Aksine Celera Genomics takımı, Venter ve arkadaşlarının ilk olarak *H. influenzae* genomunu dizilemek için kullandıkları tüm genom tek vuruş (shotgun) dizileme yaklaşımını



Birbirini takip eden kümeler (kontigler) halinde düzenlenmiş ve insan kromozomlarına haritalanmış BAC klonlarını kullanarak genom dizileme stratejisi.

kullandılar. Bu yaklaşımda DNA fragmanları rastgele dizilendi ve fragmanların birbirini takip eden kısımları daha sonra tam bir genom dizisi oluşturacak şekilde kullanıldı. Her iki dizi insan genomunun ökromatin kısmını yani 2900 Mb DNA'yı kapsamaktadır ve genomun heterokromatin yani tekrardan zengin kısmı (yaklaşık 300 Mb) halen dizilenmemiştir.

Bu ilk yayımlanan sürümlerin ikisinin de tam değil taslak diziler olduğunu bilmek önemlidir. Dizide boşluklar vardır ve yayımlanan taslaklar genomun ökromatin kısmının sadece %90'ının dizisine karşılık gelir. Ayrıca, taslaklardaki bazı dizi blokları yanlış oluşturulmuş olabilir. Yinede bu taslaklardaki dizilerin çok büyük oranda doğru olduğu kabul edilmektedir ve biyoloji ve tıp için büyük bir kaynak oluştururlar.

Etki

İnsan genomu dizilerinden hemen birkaç önemli sonuca varıldı. Birincisi, insan geni sayısı 30.000 ile 40.000 arasında gibiydi ve bu da daha önceden yaygın olarak kabul edilen 100.000 tahmininden çok daha düşüktü. Ancak, ilginç olarak alternatif kırpılma insan genomunda sık yer alıyor gibi görünmektedir ve böylece her gen ortalama olarak 3 farklı protein kodlayabilir. İntronlar insan genomunun yaklaşık %25'ini ve tekrarlanan diziler yaklaşık %60'ını oluşturur. İnsan DNA'sının %40'tan fazlasının revers transkripsiyondan elde edilen dizilerden oluşması ilginçtir ve bu da genomumuzun şekillenmesinde bu bilgi transferi yönteminin önemini ortaya koyar.

Hemen varılan bu sonuçlar dışında insan genomunun dizisi diğer organizmaların genom dizileriyle birlikte biyoloji ve tıp için gelecek yıllarda yeni bir temel oluşturacaktır. Genom dizisinin etkisi yeni genler ve işlevlerin bulunmasında, gen düzenlenmesinin anlaşılmasında, insan hastalıklarının temelinin aydınlatılmasında ve insanların genetik yapısına göre hastalık önleme ve tedavi için yeni stratejiler oluşturulmasıyla hissedilecektir. İnsan genomu bilgilerinin nihayi katkısını bir bilimsel toplantıda Venter ve arkadaşlarının "İnsan biyolojisinin temel hedefi akıllarımızın nasıl kendi varlığımızı araştırmaya yetecek kadar düşünceleri organize edebilecek düzeye geldiğini açıklamaktır" cümlesi ile tanımlanabilir.

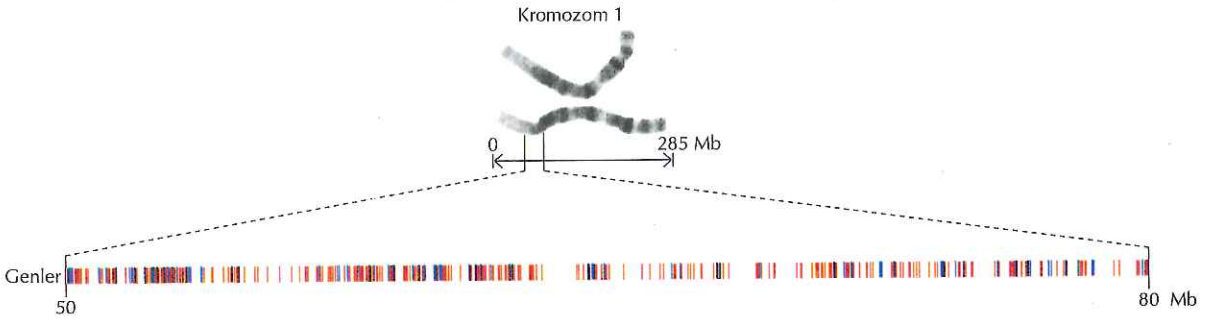
Craig Venter

Eric Lander

kullanıldığı bir tek vuruş (shotgun) yaklaşımı tercih etti. Bu dizilerin ikisi de başlangıçta tamamlanmamış taslaklardı ve genomun ökromatin bölgesinin yaklaşık %90'ı dizilenmiş ve yapılandırılmıştı. Daha sonra devam eden çabalar taslak dizilerdeki boşlukları doldurmuştur ve sonunda 2003'te yüksek kalitede bir insan genomu dizisi elde edilmiştir.

Genomun dizilenmiş ökromatin kısmı yaklaşık 2.9×10^6 kb DNA'yı kapsar (Şekil 4.32). Genomun toplam büyüklüğü yaklaşık 3.2×10^6 kb'dir ve genomun kalan %10'u (0.3×10^6 kb) heterokromatindeki çok tekrarlanan dizilere karşılık gelir. Bu bölümde daha önceden de tartışıldığı gibi, çoğu genomda RNA aracılarının revers transkripsiyonu ile hareket etmiş, yer değiştirebilen elemanlar olan yayılmış diziler, insan ökromatin dizisinin yaklaşık %45'ini oluşturur. Genomun bir diğer %5'i, duplike DNA parçalarından oluşur, bu yüzden insan genomunun yaklaşık %60'ı tekrarlanan DNA dizilerinden oluşur.

Genom dizilemenin büyük bir süprizi insan geni sayısının beklenmedik ölçüde düşük çıkmasıydı. İnsan genomu sadece 30,000 – 40,000 gen kapsıyor gibidir ve bu da daha önceleri insan genomunda tahmin edilen yaklaşık 100,000 gen sayısından çok daha azdır. Bunun yerine insanlarda *C. elegans* ve *Drosophila* gibi daha basit hayvanların sadece yaklaşık iki katı gen var gibidir. Hatta insanlarda pirinçten daha az gen bulunabilir ve bu durum genom dizilemenin sonuçlarının ortaya



Şekil 4.32 İnsan kromozom 1'inin dizisi
İnsan kromozom 1'inin taslak dizisinde tanımlanan genlerin pozisyonları belirtilmiştir (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. *Nature* 409:860).

çıkardığı temel sonuçlardan birinine dikkat çeker: bir organizmanın biyolojik karmaşıklığı sadece genomundaki gen sayısının bir sonucu değildir. Öte yandan insan genlerinde çok miktarda alternatif kesip-ekleme var gibidir ve bu da bir genin birden fazla proteini tanımlamasına izin verir (bakınız Şekil 4.5). Günümüze kadar yapılan analizler sonucunda alternatif kesip-eklemelerin ortalama insan geninden üç veya daha fazla birbirinden ayrı mRNA oluşumuna yol açabileceği görülmektedir.

Bunun sonucunda tahmin edilen 30,000 – 40,000 insan geni 100,000 veya daha fazla birbirinden ayrı proteini kodlayabilir. Alternatif kesip-ekleme *C. elegans* ve *Drosophila*'da da görülür ama insanda olduğundan çok daha az sıklıkladır. Alternatif kesip-eklemenin insanlardaki sıklığı böylece, insanlarda *C. elegans* veya *Drosophila*'ya göre yaklaşık beş kat fazla sayıda birbirinden ayrı proteinin oluşmasını sağlayabilir.

İnsan genleri *Drosophila* veya *C. elegans*'daki genlere göre çok daha büyük mesafelere dağılmışlardır ve daha fazla intron dizisi içerirler. İnsan genlerindeki ortalama protein kodlama dizisi yaklaşık 1,400 baz çifti uzunluğundadır ve bu da *Drosophila* ve *C. elegans*'a benzer. Ancak, ortalama insan geni yaklaşık 30 kb DNA içerir ve genin %90'ından fazlası intronlara karşılık gelir. Genomun böylece yaklaşık %25'i intronlardan oluşur ve insan genomunun sadece %1 ila %1.5'u protein kodlama dizilerina karşılık gelir.

Öngörülen insan proteinlerinin %40'ından fazlası *Drosophila* ve *C. elegans* dahil diğer dizilenmiş organizmalardaki proteinlerle ilişkilidir. Bu korunmuş proteinlerin birçoğu metabolizma, DNA replikasyonu ve tamiri, transkripsiyon, translasyon ve protein trafiği gibi basit hücresel işlemlerde görev görürler. Bu insanlarda etkin olan proteinlerin birçoğu başka organizmalarda da bulunan protein domainlerinden oluşmuştur ama bu domainler insanlarda farklı proteinler oluşturacak şekilde yeni kombinasyonlarla birleşmişlerdir. *Drosophila* ve *C. elegans*'a göre insan genomu omurgalıların immün cevap, sinir sistemi ve kan pıhtılaşması gibi daha karmaşık işlevleriyle ilişkili işlevlerle ilgili genler ve ayrıca gelişme, hücre sinir sistemleri ve transkripsiyon düzenlemeleriyle ilişkili daha fazla sayıda gen kapsar.

Diğer genomların dizileriyle birlikte insan genom dizisi hücre ve moleküler biyoloji çalışmaları için yeni bir temel oluşturan çok geniş bilgi sağlar. Daha sonraki bölümlerde de görüleceği gibi birçok hücresel işlevle ilgili yeni genler genom dizisinin analizi ve diğer organizmaların dizileriyle karşılaştırma sonucuyla tanımlanabilir. Bu genlerin ve genom dizileme sonucunda ortaya çıkacak yeni genlerin işlevlerinin araştırılması önümüzdeki yıllarda birçok hücre işlevi çalışmasının temelini oluşturacaktır. İnsan genomu dizisinin mevcut olması insanlığın kanser, kalp hastalığı, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi dejeneratif sinir sistemi hastalıklarıyla ilişkili yeni genlerin ortaya çıkarılmasında büyük alanda uygulama bulacaktır.

İnsan genomu dizisinin şifresinin çözülmesi hem genlerin protein kodlayan dizilerini ortaya çıkaracak, hem de gen ifadesini kontrol eden düzenleyici dizileri belirleyecektir. Daha sonraki bölümlerde tartışıldığı gibi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi karmaşık çok hücreli organizmaların gelişimi dahil, hücre işlevinin birçok yönü için çok önemlidir. Gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması günümüzde hücre ve moleküler biyoloji için büyük bir hedeftir ve genom dizilerinin varlığının bu işleme çok büyük bir katkısı olması beklenmektedir. Ne yazık ki şu anda, gen düzenleyici dizileri tanımlamak özellikle insanınki gibi büyük genomlarda protein kodlayan dizileri tanımlamaktan çok daha zordur. Bu tip çalışmaların benzer organizmaların genom dizisinin karşılaştırılmasıyla kolaylaşacağı düşünülmektedir. Örneğin, yakın zamanda tamamlanmış olan fare genomu dizisi beklendiği şekilde insan ve fare proteinlerini kodlayan dizileri arasında büyük bir miktarda koruma göstermektedir. Gen düzenleyici dizilerin benzer bir şekilde koruması, bu tip dizilerin tam olarak saptanmasını ve işlevlerinin anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Birbirine yakın türlerin başka genom dizilerinin saptanması türler arasındaki farklılıkların temelini açıklamamızı sağlayacaktır. Örneğin yakında insanların genomunu, hem *Drosophila* ve *C. elegans* gibi omurgasızlar, hem fare gibi diğer memeliler, hem de şempanze gibi diğer primatlarla karşılaştırabileceğiz. Ayrıca farklı bireylerin dizilerini birbirleriyle karşılaştırabileceğiz. Bireylerin genomları sadece bin bazdan birinde farklıdır. Kişiler arasındaki bu tip farklılıkların analizi, belirli genlerin farklı hastalıklara duyarlılıkla ilişkilendirilmesini sağlayacak ve doktorların hastaların genetik yapısına göre hastalıkları önleme ve tedavi için stratejiler geliştirmelerini sağlayacaktır. Farklı bireyler arasındaki genomların karşılaştırılması genlerimizin kendine özgü başka özelliklere katkısını aydınlatabilir. Örneğin atletik yetenek veya zeka ve karmaşık insan davranışlarına yol açan çevreyle ilgili genler arasındaki etkileşimleri daha iyi anlamamızı sağlayabilir.

ÖZET

ÖKARYOT GENOMLARIN KARMAŞIKLIĞI

İntronlar ve Eksonlar: Çoğu ökaryotik gende kodlama dizisi parçalarının (eksonlar) kodlamayan diziler (intronlar) tarafından bölündüğü bir yapı vardır. Karmaşık ökaryotlarda intronlar DNA'da eksonlara göre on kattan fazla yer kaplayabilir.

Tekrarlanan DNA Dizileri: Memeli DNA'sının %50'sinden fazlası çok tekrarlanan DNA dizisinden oluşur ve bunların bazıları genom başına 10^5-10^6 kopya halinde bulunurlar. Bu diziler arasında basit dizi tekrarları ve genom içinde RNA veya DNA aracıları sayesinde hareket etmiş olan tekrarlanan elemanlar bulunur.

Gen Duplikasyonları ve Psödogenler: Birçok ökaryot gen çok sayıda kopya halinde bulunur ve bunlara gen ailesi adı verilir. Bunlar atalardan gelen genlerin duplikasyonuyla oluşmuştur. Bazı gen ailesi üyeleri değişik dokularda veya değişim esnasında farklı evrelerde görev yaparlar. Başka gen ailesi üyeleri (psödogenler) mutasyonlarla inaktive olmuşlardır ve artık işlevsel genleri temsil etmezler. Gen duplikasyonları ya bir DNA parçasının duplikasyonuyla ya da mRNA'nın ters transkripsiyonuyla oluşurlar ve bir işlenmiş psödogen oluştururlar. İnsan genomunun yaklaşık %5'i duplike DNA parçalarından oluşur. Ayrıca insan genomunda birkaç bin işlenmiş psödogen olduğu tahmin edilmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

gen, aralayıcı dizi, ekson, intron, RNA kırpılması, kilobaz (kb), alternatif kırpılma

basit dizi tekrarı, uydu DNA, SINE, LINE, retrotranspozon, DNA transpozon

gen ailesi, psödogen, işlenmiş psödogen

Yüksek Ökaryot Genomlarının Yapısı: Karmaşık ökaryotlarda genomun sadece küçük bir kısmı protein kodlayıcı dizilere karşılık gelir. İnsan genomunda 30,000-40,000 gen bulunduğu tahmin edilmektedir ve protein kodlayan diziler DNA'nın sadece %1-1.5'una karşılık gelir. İnsan genomunun yaklaşık %25'i intronlardan oluşur ve %60'tan fazlası tekrarlanan ve duplike DNA dizilerinden oluşmuştur.

KROMOZOMLAR VE KROMATİN

kromatin, histon, nükleozom, nükleozom kor partikülü, kromatozom, ökromatin, heterokromatin

Kromatin: Ökaryotik hücrelerin DNA'sı nükleozomlar oluşturacak şekilde histonlar etrafına sarılmıştır. Kromatin nükleozomların daha yüksek derecede yapılara, mitoza giren hücrelerde çok yoğun metafaz kromozomları dahil, katlanmasıyla daha da sıkı hale gelebilir.

sentromer, kinetokor

Sentromerler: Kardeş kromatidler arasında bir birleşme bölgesi ve mitozda iğ ipliklerinin bulundukları yerler olarak görev yapan, ökaryot kromozomların özelleşmiş bölgeleridir.

telomer

Telomerler: Telomerler ökaryot kromozomların uçlarını korumak için gerekli, özelleşmiş dizilerdir.

TAM GENOMLARIN DİZİLERİ

biyoinformatik
megabaz (Mb), açık okuma çerçevesi

Prokaryot Genomlar: *E. coli* dahil altmıştan fazla bakterinin genomu tam olarak dizilenmiştir. *E.coli* genomunda 4288 gen vardır ve protein kodlayan diziler DNA'nın yaklaşık %90'ını oluşturur.

Maya Genomu: Dizilenen ilk ökaryot genomu *S. cerevisiae* olmuştur. *S. cerevisiae* genomunda yaklaşık 6,000 gen vardır ve protein kodlama dizileri genomun yaklaşık %70'ini oluşturur. Füzyon mayası *S. pombe*'nin genomunda *S. cerevisiae*'ya göre daha az gen (yaklaşık 5,000) ve daha çok intron vardır ve protein kodlayan diziler *S. pombe* genomunun yaklaşık %60'ını oluşturur.

maya yapay kromozomu (YAC), politen kromozom, bakteriyel yapay kromozom (BAC)

***Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* Genomları:** *C. elegans* genomu ilk dizilenen çok hücreli organizma genomudur. *C. elegans* genomunda yaklaşık 19,000 protein kodlayan dizi vardır ve bunlar genomun sadece yaklaşık %25'ini oluşturur. *Drosophila*'nın genomunda yaklaşık 13,600 gen vardır ve protein kodlayan diziler genomun yaklaşık %13'ünü oluşturur. *Drosophila*'da *C. elegans*'dan daha az gen bulunsa da birçok gen her iki türde de bulunur ve her iki türün 8,000-9,000 kendine özgü gen bulundurduğu görülmektedir. Bu genlerin bazıları *Drosophila, C. elegans* ve maya arasında paylaşılır ve bu genler tüm ökaryotik hücrelerde ortak işlevleri olan proteinleri kodluyor olabilir. Ancak *Drosophila* ve *C. elegans* genlerinin çoğu mayada bulunmaz ve muhtelen çok hücreli hayvanların düzenlenmesi ve gelişmesinde görev yapıyorlardır.

Bitki Genomları: Küçük çiçekli bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın genomu yaklaşık 26,000 gen içerir ve bu da şaşırtıcı şekilde *Drosophila* veya *C. elegans*'da bulunan gen sayısından fazladır. Ancak bu genlerin çoğu Arabidopsis genomunun büyük parçalarının duplikasyonunun sonucudur ve bunun sonucunda Arabidopsis'deki kendine özgü gen sayısı 15,000 kadardır. Bu genlerin birçoğu bitkilere özgüdür ve bunlar arasında bitki

fizyolojisi gelişimi ve savunmasıyla ilgili genler vardır. Pirinç genomunun dizisi tarımsal açıdan özellikle önemlidir çünkü pirinç dünya nüfusunun yarısından fazlası için temel gıdadır. Pirinç genomunun dizi taslağında 30,000 ile 50,000 arasında gen bulunduğu tahmin edilmektedir; bunların birçoğu duplikedir ve büyük genom parçalarının duplikasyonu sonucunda ortaya çıkmış olabilirler.

İnsan Genomu: İnsan genomunda 30,000-40,000 gen bulunduğu düşünülmektedir ve bu da *Drosophila* ve *C. elegans* gibi daha basit hayvanlarda bulunan gen sayısının sadece iki katıdır. Ancak alternatif kesip-ekleme insanlarda daha sık gibidir ve ortalama genden üç veya daha fazla mRNA (ve protein) üretilmesini sağlayabilir. Öngörülen insan proteinlerini %40'ından fazlası *Drosophila* ve *C. elegans* dahil dizilenmiş diğer organizmalardaki proteinlerle ilişkilidir. Ayrıca insan genomunda sinir sistemi, bağışıklık sistemi, kan pıhtılaşması, gelişme, hücre sinyal sistemi ve gen ifadesinin düzenlenmesiyle ilgili çok sayıda gen bulunur.

floresan *in situ* hibridizasyon (FISH)

Sorular

1. Birçok ökaryot organizmanın genom büyüklüğü karmaşıklıklarının gerektirdiğinden çok daha fazla gibidir. Bu paradoksu açıklayın.

2. Adenovirus mRNA'sı üzerine yapılan çalışmalar sırasında intronlar ve eksonlar nasıl bulunmuştur?

3. Alternatif kırpılmanın önemi nedir?

4. Basit dizili tekrarlanan DNA, nükleer DNA'nın esas kısmından nasıl ayrılabilir?

5. Sentromerle kinetokor arasındaki fark nedir?

6. Maya sentromerleri tek bir mikrotübüle tutunan bir kinetokor oluştururken çoğu hayvanda 20 iğ mikrotübülüne tutunan kinetokorlar vardır. Bu sentromerlerin yapısı bu farklılıkları nasıl yansıtır?

7. Kromozomlarda telomerlerin iki ana işlevi nedir?

8. Dairesel plazmidlere bir sentromer dizisi sağlanıp maya hücrelerine sokulduklarında genleri her hücre bölünmesinde normal olarak çoğalır ve ayrılır; ama bir bölgeden bir restriksiyon endonükleaz ile kesilip bir lineer kromozom oluşturulduğunda plazmid genleri mayadan çabucak kaybedilir. Açıklayın. Öne sürdüğünüz açıklamayı kesinleştirmek için başka hangi deneyi yapardınız?

9. Bir açık okuma çerçevesi nedir ve genom analizindeki önemi nedir?

10. Farklı bireylerin genom dizileri birbirinden ne kadar farklıdır?

11. Tekrarlanan DNA dizileri ilk olarak DNA tekrar bir araya gelme hızının çalışılması ile saptanmıştır. Genomda 1000 kere tekrarlanan bir dizi için sadece tek kopya olan bir gene göre hangi oranda farklı tekrar bir araya gelme beklenebilir?

12. İnsan genom haritasında yaklaşık 30,000 cDNA'nın yeri saptanmıştır. Bu belirleyiciler arasındaki ortalama mesafe nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Ökaryot Genomlarının Karmaşıklığı

Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3171-3175. [P]

Breathnach, R., J. L. Mandel and P. Chambon. 1977. Ovalbumin gene is spiit in chicken DNA. *Nature* 270:314-319. [P]

Britten, R. J. and D. E. Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540. [P]

Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220. [R]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1-8. [P]

Fritsch, E. F., R. M. Lawn and T. Maniatis. 1980. Molecular cloning and characterization of the human β-like globin gene cluster. *Cell* 19: 959-972. [P]

Gilbert, W. 1985. Genes-in-pieces revisited. *Science* 228:823-824. [R]

Gilbert, W., S. J. de Souza and M. Long. 1997. Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7698-7703. [R].

Henikoff, S., E. A. Greene, S. Pietrokovski, P. Bork, T. K. Attwood and L. Hood. 1997. Gene families: The taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278: 609-614. [R]

Hentschel, C. C. and M. L. Birnsteil. 1981. The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25:301-313. [R]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. initial Sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860-921. [P]

Kazazian, H. H., Jr. 2000. Ll retrotransposons shape the mammalian genome. *Science* 289:1152-1153.[R]

Kidwell, M. G. and D. Lisch. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7704-7711. [R]

Little, P. F. R. 1982. Globin pseudogenes. *Cell* 28:683-684. [R]

Moran, J. V., R. J. DeBerardinis and H. H. Kazazian Jr. 1999. Exon shuffling by Ll retrotransposition. *Science* 283:1530-1534. [P]

Schmid, C. W. and W. R. Jelinek. 1982. The *Alu* family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216:1065-1070. [R]

Stoltzfus, A., D. F. Spencer, M. Zuker, J. M. Logsdon, Jr. and W. F. Doolittle. 1994. Testing the exon theory of genes: The evidence from protein structure. *Science* 265:202-207. [R]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. VVeissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse β-globin gene is transcribed vvithin the 15S β-globin mRNAprecursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1309-1313. [P]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351. [P]

Kromozomlar ve Kromatin

Biackburn, E. H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673. [R]

Carbon, J. 1984. Yeast centromeres: Structure and function. *Cell* 37:351-353. [R]

Clarke, L. 1990. Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet.* 6:150-154. [R]

Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature 287:504-509. [P]

Greider, C. W. 1999. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97:419-422. [R]

Grunstein, M. 1992. Histones as regulators of genes. *Sci. Am.* 267(4): 68-74B. [R]

Heck, M. M. S. 1997. Condensins, cohesins, and chromosome architecture: How to make and break a mitotic chromosome. *Cell* 91:5-8. [R]

Henikoff, S., K. Ahmad and H. S. Malik. 2001. The centromere paradox: stable inheritance with rapidiy evolving DNA. *Science* 293:1098-1102. [R]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871. [P]

Koshland, D. and A. Strunnikov. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 12: 305-333. [R]

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260. [P]

Murphy, T. D. and G. H. Karpen. 1998. Centromeres take flight: Aipha satellite and the quest for the human centromere. *Cell* 93:317-320. [R]

Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168:1356-1358. [P]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828. [P]

Pluta, A. F., A. M. MacKay, A. M. Ainsztein, A. G. Goldberg and W. C. Earnshaw. 1995. The centromere: Hub of chromosomal activities. *Science* 270:1591-1594. [R]

Richmond, T.]., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes and A. Klug. 1984. Structure of the nucieosome core partide at 7 Å resolution. *Nature* 311: 532-537. [R]

Saitoh, Y. and U. K. Laemmii. 1994. Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609-622. [P]

Schueler, M. G., A. W. Higgins, M. Katharine Rudd, K. Gustashaw and H. F. Willard. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294:109-115.[P]

Sun, X., J. Wahlstrom and G. Karpen. 1997. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91: 1007-1019. [Pl

Szostak, J. W. and E. H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255. [P]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature* 408:796-815. [P]

Tyler-Smith, C. and G. Floridia. 2000. Many paths to the top of the mountain: diverse evolutionary solutions to centromere structure. *Cell* 102: 5-8. [R]

Van Holde, K. E. and J. Zlatanovai. 1995. Chromatin higher order structure: Chasing a mirage. *J. Biol. Chem.* 270: 8373-8376. [R]

Wiens, G. R. and P. K. Sorger. 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93:313-316. [R]

Zakian, V. A. 1995 Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607. [R]

Tam Genom Dizileri

Adams, M. D. and 194 others. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science* 287: 2185-21W. [Pİ

Baltimore, D. 2001. Our genome unveiled. *Nature* 409: 814-816. [R]

Bennetzen, J. 2002. Opening the door to comparative plant biology. Science 296: 60-63. [R]

Blattner, F.R., G. Plunkett III., C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462. [F]

Bult, C. J. and 39 others. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* 273:1058-1073, [P]

Chakravarti, A. 2001. Single nucleotide polymorphisms: to a future of genetic medicine. *Nature* 409:822-823. [R]

Chervitz, S. A., L. Aravind, G. Sherlock, C. A. Ball, E. V. Koonin, S. S. Dwight, M. A. Harris, K. Dolinski, S. Mohr, T. Smith, S.

Weng, J. M. Cherry and D. Botstein. 1998. Comparison of the complete protein sets of ıvorrn and yeast: Orthology and divergence. *Science* 282: 2022-2028. [R]

Fleischmann, R. D., and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512. [P]

Fraser, C. M. and 28 others. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium. Science* 270:397-403. [P]

Garza, D., J. W. Ajioka, D. T. Burke and D. L. Hartl. 1989. Mapping the *Drosophila* genome with yeast artificial chromosomes. *Science* 246: 641-646. [R]

Goff, S. A. and 54 others. 2002. A draft sequence of the rice genome *(Oryza sativa L.* ssp. *Japonica). Science* 296:92-100. [P]

Goffeau, A. and 15 others. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.[P]

Martienssen, R. and W. R. McCombie. 2001. The first plant genome. *Cell* 105: 571-574. [R]

Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002. Initial sequence and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562. [P]

Oliver, S. G. and 146 others. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38-46. [P]

Peltonen, L. and V. A. McKusick. 2001. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 291:1224-1229. [R]

Rubin, G. M. 2001. The draft sequences: comparing species. *Nature* 409: 820-821. [R]

Rubin, G. M. and 54 others. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204-2215. [R]

The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature* 408:796-815. [P]

The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018. [P]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351. [P]

Walbot, V. 2000. A green chapter in the book of life. *Nature* 408: 794-795. [R]

Wood, V. and 132 others. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe. Nature* 415:871-880. [P]

Yu, J. and 99 others. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296: 79-92. [P]

Bölüm 5

Genomik DNA'nın Replikasyonu, Korunması ve Yeniden Düzenlenmesi

DNA Replikasyonu 179

DNA Onarımı 192

Homolog DNA Dizileri Arasında Rekombinasyon 204

DNA Yeniden Düzenlenmeleri 211

ANAHTAR DENEY: İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi 218

MOLEKÜLER TIP: Kolon Kanseri ve DNA Onarımı 203

ÜREMENİN TEMEL BİYOLOJİK SÜRECİ atadan döle genetik bilginin tam ve doğru olarak aktarılmasını gerektirir. Genomik DNA'nın doğru replikasyonu bütün hücre ve organizmaların yaşamları için şarttır. Hücre her bölünmesinde genomunu iki katına çıkarmalıdır. Ökaryot ve prokaryotlarda kromozomları oluşturan büyük DNA moleküllerinin kopyalanması için karmaşık enzimatik mekanizmalar gereklidir. Ek olarak, hücreler radyasyon gibi çevresel ajanlardan kaynaklanan DNA hasarının onarımı ve bazen DNA replikasyonu sürecinde oluşan hataların düzeltilmesini sağlayacak mekanizmalar da geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardaki bozukluklar genomik DNA'nın korunması ve doğru kopyalanmasında yetersizliğe yol açar. Bu tip bir yetersizlik kanser oluşumu gibi kötü sonuçlar doğurabilir.

Hatasız DNA replikasyonunun ve korunmasının önemine rağmen, hücre genomları statik olmaktan çok uzaktır. Türlerin evrimleşmesi için, mutasyonlar ve genlerin yeniden düzenlenmeleriyle, bireyler arasında genetik çeşitliliğin korunması gerekir. Mayoz sırasında eş kromozomlar arasındaki rekombinasyon, ebeveyne ait genlerin yeni jenerasyonda yeni bileşimlerle, yeniden düzenlenmesini sağlayarak, bu konuda önemli bir rol alır. Genom içerisindeki DNA dizinlerinin yeniden düzenlenmesinin de, yeni genetik bilgi bileşimleri oluşturarak, evrime katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bazı DNA yeniden düzenlenmeleri, hücre ya da organizmaların farklılaşma ve gelişim süreçlerinde gen ekspresyonlarını düzenlenmek üzere programlanmıştır. İnsanlarda, öne çıkan bir örnek, immün sistemin gelişimi sürecinde antikor genlerinin yeniden düzenlenmesidir. O halde, genetik bilginin korunması ile değişmesi arasındaki hassas denge, bireysel organizmaların gelişimi kadar türlerin evrimi açısından da kritiktir.

DNA'nın Replikasyonu

Bölüm 3'de anlatıldığı gibi, DNA replikasyonu, her bir atasal ipliğin yeni, tamamlayıcı iplik için kalıp oluşturduğu yarı korunumlu bir süreçtir. Yeni sentezlenen DNA ipliğine deoksiribonükleozid 5'-trifosfatların (dNTP'ler) eklenmesini katalizleyen DNA polimeraz,

replikasyondan sorumlu asıl enzimdir. Bununla beraber, DNA replikasyonu tek bir enzimatik reaksiyondan çok daha karmaşıktır. Başka proteinler de rol oynar ve hücre çoğalmasında gerekli olan düşük hata sıklığıyla bağdaşabilecek, replikasyon doğruluğunu garantileyecek, yanlış düzeltme (proofreading) mekanizmaları gerekmektedir. İlave proteinler ve özgül DNA dizileri de, replikasyonun başlaması ve ökaryot kromozomlarının uçlarının kopyalanması için gereklidir.

DNA Polimerazlar

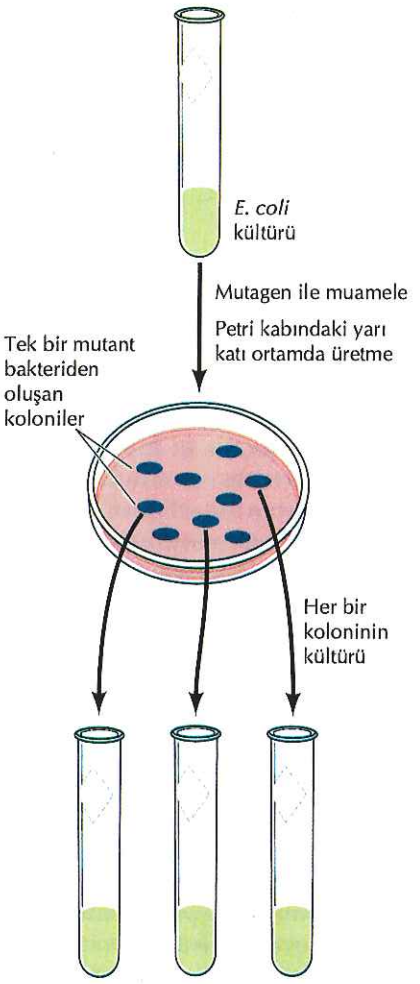
DNA polimeraz ilk kez, 1956'da Arthur Kornberg tarafından *E.coli* özütlerinde tanımlandı. Bu enzim izolasyonu, ilk olarak Watson ve Crick tarafından öne sürülmüş olan DNA replikasyon modelinin biyokimyasal temellerini sağlayacak biçimde, bir DNA kalıbını doğru şekilde kopyalayabildiği için, moleküler biyolojide bir dönüm noktası olmuştur. İronik olarak, ilk kez tanımlanan bu DNA polimeraz (şimdi DNA polimeraz I olarak adlandırılmaktadır) *E. coli* DNA replikasyonundan asıl sorumlu enzim değildir. Aslında, prokaryot ve ökaryot hücrelerin, DNA onarımında ve replikasyonunda belirgin roller alan, farklı tipte DNA polimerazlar barındırdıkları artık bilinmektedir.

DNA polimerazların çeşitliliği ilk kez, DNA polimeraz I yönünden kusurlu olan mutant *E.coli* suşlarının izolasyonu ile ortaya çıktı (Şekil 5.1). *E.coli* kültürleri yüksek sıklıkta mutasyon oluşumunu indükleyen bir kimyasal ile (**mutajen**) muamele edildi ve her bir bakteri kolonisi, polimeraz I'i eksik mutant suşun bulunması için izole edilerek tarandı. Birkaç bin koloninin analizi ile, hedeflenen, polimeraz I aktivitesi hemen tümüyle kayıp olan mutant suş saptandı. Mutant bakteri şaşırtıcı biçimde, DNA replikasyonu için polimeraz I'in gerekli olmadığı sonucunu ortaya koyarak, normal şekilde çoğaldı. Diğer yandan, mutant bakteriler DNA'ya zarar veren ajanlara (örn., ultraviyole ışığı) aşırı derecede duyarlıydı. Bu da, polimeraz I'in DNA replikasyonundan ziyade, DNA hasarının onarımında görev aldığını göstermekteydi.

Polimeraz I'in replikasyonda gerekli olmadığı şeklindeki sonuç, *E.coli*'nin başka DNA polimerazlar içermesi gerektiği anlamı taşıyordu ve sonraki araştırmalar, DNA polimeraz II ve III olarak adlandırdığımız iki enzimin bulunmasına yol açtı. Bu enzimlerin potansiyel rolleri, uygun mutantlar izole edilerek araştırıldı. Polimeraz II mutantı *E.coli* suşlarının normal olarak çoğaldıkları görüldü ve bu enzimin, özel bir, hataya açık DNA onarımında ("DNA Onarımı" bölümünde tartışıldı) rolü olduğu ancak son zamanlarda anlaşılabildi. Buna karşın, sıcaklığa-duyarlı polimeraz III mutantları, yüksek sıcaklıklarda DNA'larını kopyalayamadı ve izleyen çalışmalar, polimeraz III'ün *E.coli*'de esas replikatif enzim olduğunu doğruladı.

Bugün, polimeraz III'e ek olarak polimeraz I'in de *E.coli* DNA replikasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Orijinal polimeraz I mutantı, bu enzim açışından tam olarak kusurlu değildi ve daha sonraki çalışmalar, bu suşda kalan polimeraz I aktivitesinin, replikasyon sürecinde önemli rol oynadığını gösterdi. *E.coli* DNA'sının replikasyonu için, detaylarını ileride tartışacağımız, iki farklı DNA polimeraz gereklidir.

Ökaryot hücreler beş klasik DNA polimeraz içerirler: α, β, γ, δ ve ε. Polimeraz γ mitokondride yerleşiktir ve mitokondri DNA'sının replikasyonundan sorumludur. Diğer dört enzim çekirdekte yerleşiktir ve bu yüzden, nükleer DNA'nın replikasyonu için adaydırlar.



Polimeraz 1'i olmayan mutantın tanımlanması için DNA polimeraz aktivitesinin taranması

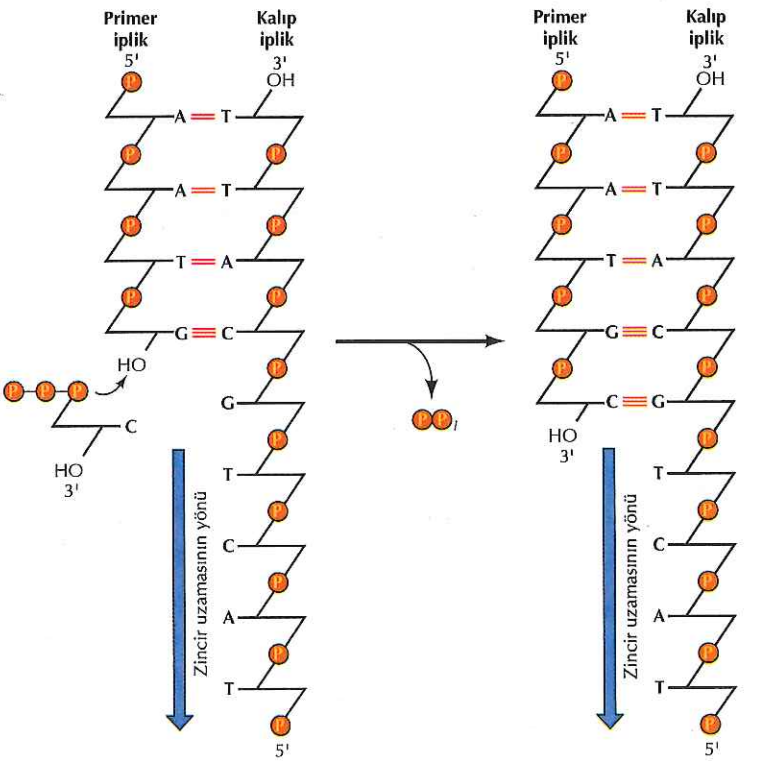
Şekil 5.1 Polimeraz I kusurlu bir mutantın izolasyonu

E.coli kültürü kimyasal bir mutajen ile muamele edildi ve her bir bakteri kolonisi yarı katı ortamda üretilerek seçildi. Daha sonra, polimeraz I'i bulunmayan mutantı tanımlamak için binlerce koloni kültüre edildi ve tarandı.

Polimeraz α, δ, ve ε, bölünen hücrelerde oldukça aktiftirler ve bu nedenle, replikasyonda görevli oldukları düşünülmektedir. Bunun aksine, β bölünen hücrelerde olduğu kadar bölünmeyen hücrelerde de aktiftir, bu da, DNA hasarının onarımında görevli olması ile uyumludur.

İki tip deney, α, δ ve ε'un DNA replikasyonundaki rollerinin aydınlatılmasında önemli kanıtlar sağlamıştır. Birincisi, SV40 gibi bazı hayvan viruslarının DNA replikasyonunun, hücre içermeyen özütlerde çalışılabilmesidir. Replikasyonun *in vitro* çalışılabilir olması enzimlerin doğrudan tanımlanmasını sağlamış ve SV40 DNA replikasyonu için polimeraz α ve δ'nın gerekli olduğu, bu hücresiz sistemlerin analizi ile gösterilmiştir. İkincisi, α, δ ve ε'un memeli hücrelerinde olduğu gibi mayalarda da bulunuyor olması, etkili maya genetiği çalışmalarıyla (bkz. Bölüm 3) biyolojik rollerinin doğrudan test edilmesine imkan sağlamıştır. Bu çalışmalarla, bu üç DNA polimerazdan herhangi birinin eksik olduğu maya mutantlarının çoğalamadığının gösterilmesi, polimeraz α ve δ kadar ε'un da DNA replikasyonunda kritik rolü bulunduğu anlamı taşımaktadır. Bununla birlikte, daha ileri çalışmalar, mayada DNA polimeraz ε'un esas işlevinin, DNA polimeraz enzim aktivitesini gerektirmediğini gösterdi. DNA replikasyonundaki rolü hala anlaşılamamış olmasına rağmen, hücresiz sistemlerde ve mayalarda polimeraz ε'un yokluğunda, DNA replikasyonunun katalizi için yeterli olan polimeraz δ'ya, fonksiyon açısından benzer olabileceği düşünülmektedir.

Bilinen tüm DNA polimerazlar, DNA replikasyonu için önemli anlam içeren iki temel özelliği paylaşırlar (Şekil 5.2). İlk olarak, tüm polimerazlar, uzayan zincirin 3' hidroksil grubuna bir dNTP ekleyerek, DNA'yı 5'→ 3' yönünde sentezlerler. İkincisi, DNA polimerazlar yeni deoksiribonükleotidi daha önceden sentezlenen ve kalıp ipliğe hidrojen bağı ile bağlı primer ipliğine ekleyebilirler, serbest



Şekil 5.2 DNA polimeraz tarafından katalizlenen reaksiyon
Bilinen tüm DNA polimerazlar, uzayan DNA ipliğinin 3'hidroksil ucuna (primer iplik), deoksiribonükleozid 5'-trifosfat eklerler.

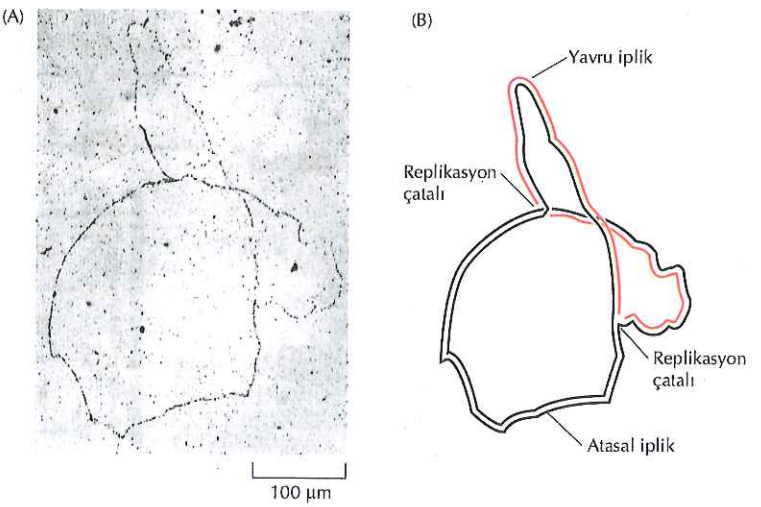
dNTP'lerin polimerizasyonunu katalizleyerek "*de novo*" DNA sentezini başlatamazlar. DNA polimerazlar bu açıdan, primerler olmadan yeni RNA ipliğini sentezleyebilen RNA polimerazlardan farklıdırlar. Bu bölümün ileriki kısımlarında tartışacağımız gibi, DNA polimerazların bu özellikleri, hücre üremesi için gerekli olan DNA replikasyonunun yüksek doğruluğunun korunması için çok önemlidir.

Replikasyon Çatalı

Replikasyon sürecindeki DNA molekülleri, ilk kez John Cairns tarafından, yeni sentezlenen DNA'nın daha sonradan görüntülenebilmesine olanak veren, radyoaktif timidin varlığında üretilmiş *E. coli*'de otoradyografi ile gözlendi (Şekil 5.3). Bazen, replikasyon sürecindeki tam çembersel moleküller gözlenebiliyordu. Bu DNA molekülleri, aktif DNA sentezinin olduğu bölgeleri gösteren, iki **replikasyon çatalı** içeriyordu. Her çatalda, DNA'nın atasal iplikleri ayrılıyor ve iki yeni yavru iplik sentezleniyordu.

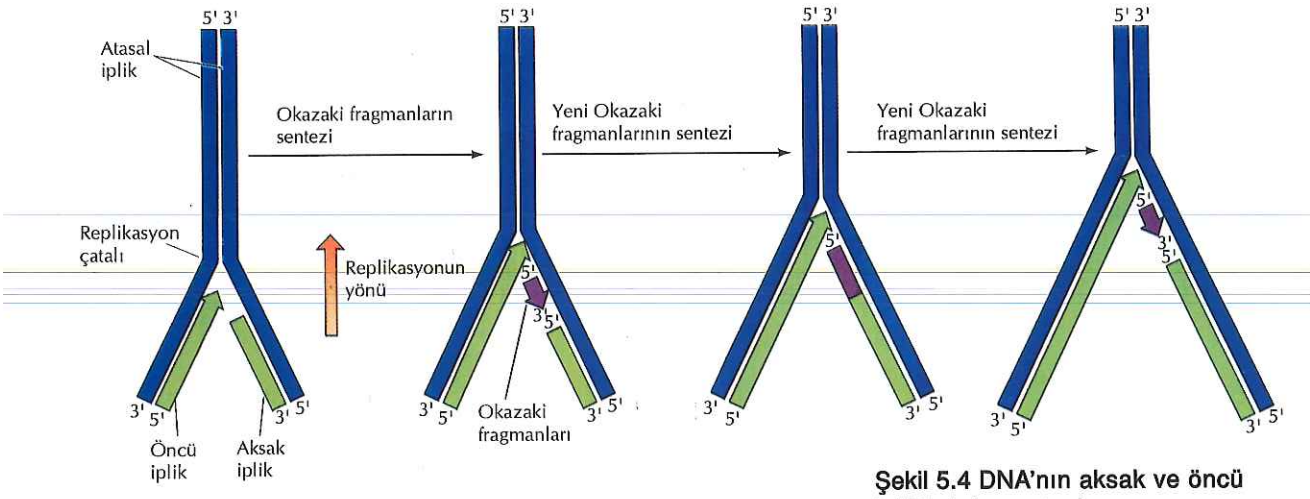
Atasal molekülün her iki ipliğine tamamlayıcı, yeni DNA ipliklerinin sentezi, DNA replikasyonunun biyokimyasının anlaşılmasında yeni bir problemi gündeme getirdi. Çift sarmal DNA'nın iki ipliğinin zıt (anti paralel) yönlenimi nedeniyle, replikasyon çatalında iki yeni ipliğin kesintisiz sentezi, bir ipliğin 5' den 3' doğrultusunda sentezlenirken, diğerinin ters doğrultuda (3'→5') sentezlenmesini gerektirmektedir. Fakat DNA polimeraz, dNTP'lerin polimerizasyonunu yalnızca 5'→3' doğrultusunda katalizlemektedir. O zaman, DNA'nın diğer yeni ipliği nasıl sentezlenebilir?

Bu problem, yalnızca bir DNA ipliğinin, genel DNA replikasyon yönünde, sürekli sentezinin gerçekleştiğini; diğer ipliğin ise replikasyon çatalının hareket yönüne ters yönde, kesintili DNA parçaları (1-3 kb) şeklinde sentezlendiğini gösteren deneylerle çözümlenmiştir (Şekil 5.4). Yeni sentezlenen bu küçük DNA parçaları (bulan kişiden dolayı **Okazaki fragmanları** olarak adlandırılır), kesintisiz yeni bir DNA ipliği oluşturmak üzere **DNA ligaz** tarafından birbirine bağlanır. Okazaki fragmanlarının (**aksak iplik**) sentezi için kullanılan kalıp iplik, replikasyon çatalının hareket yönüne doğru uzamasıyla ortaya çıktığı için, sentezin sürekli olduğu ipliğe **öncü iplik** denir.



Şekil 5.3 *E.coli* DNA'sının replikasyonu

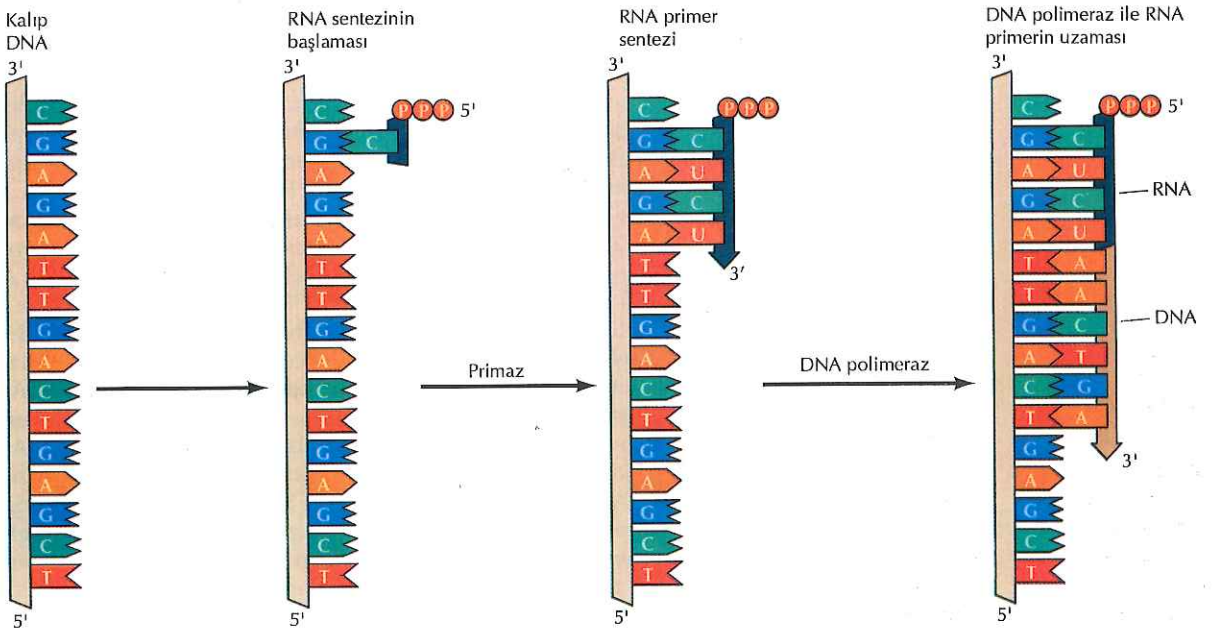
(A) [^{3}H] timidin varlığında iki jenerasyon üretilmiş olan bakterinin işaretli DNA molekülü daha sonra izole edilip fotoğraf filmini ışıklama yoluyla görüntülendi. (B) (A)'da gösterilen iki replikasyon çatalının şematik gösterimi (J.Cairns,1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:43)



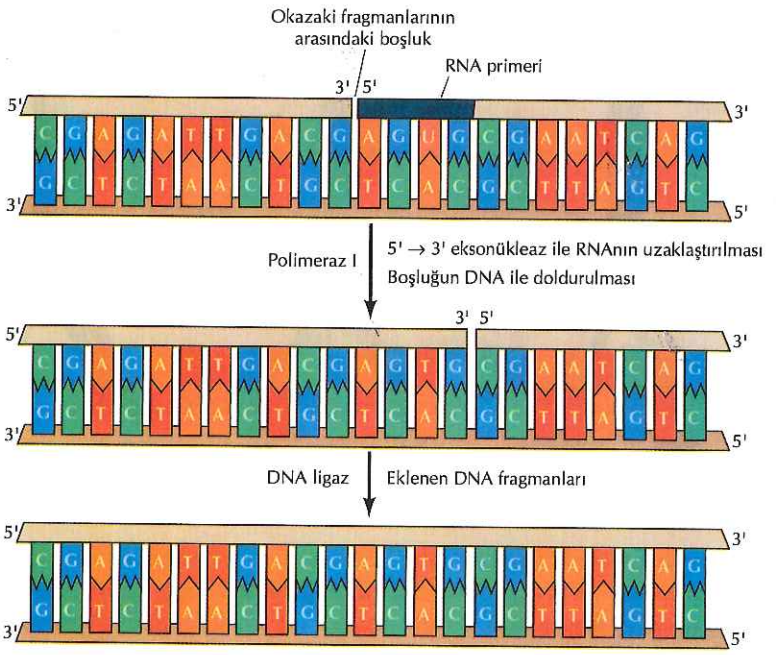
Şekil 5.4 DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin sentezi
Öncü iplik, replikasyon çatalının hareket yönünde sürekli sentezlenir. Aksak iplik replikasyonun genel yönünün tersine küçük parçalar (Okazaki fragmanları) olarak sentezlenir. Okazaki fragmanları daha sonra DNA ligaz ile birleştirilirler.

Her ne kadar, aksak ipliğin sentezinin kesintili olduğunun keşfi, replikasyon çatalında DNA'nın her iki ipliğinin uzama mekanizmasını açıklasa da, başka bir soruyu gündeme getirir: DNA polimeraz primere gereksinim duyduğu ve sentezi *de novo* başlatamadığına göre, Okazaki fragmanlarının sentezi nasıl başlar? Yanıt, kısa RNA parçalarının DNA replikasyonu için primer olarak görev yapmasıdır (Şekil 5.5). DNA sentezinin aksine RNA sentezi *de novo* olarak başlayabilir ve **primaz** adı verilen enzim, replikasyon çatalında aksak ipliğin kalıbına tamamlayıcı, kısa RNA parçaları (üç ila on nükleotid uzunlukta) sentezleyebilir. Okazaki fragmanları daha sonra, DNA polimerazın bu RNA primerlerini uzatması ile sentezlenir. Böyle RNA primer kullanımının sonucu, yeni sentezlenen Okazaki fragmanlarının RNA-DNA bağlantıları barındırmasıdır ki, bunların keşfi, DNA replikasyonunda RNA primerlerinin kullanıldığına önemli bir kanıt sağlamıştır.

Şekil 5.5 Okazaki fragmanlarının RNA primerleri ile başlatılması
Kısa RNA parçaları DNA polimeraz tarafından uzatılabilen primerler olarak görev yapar.

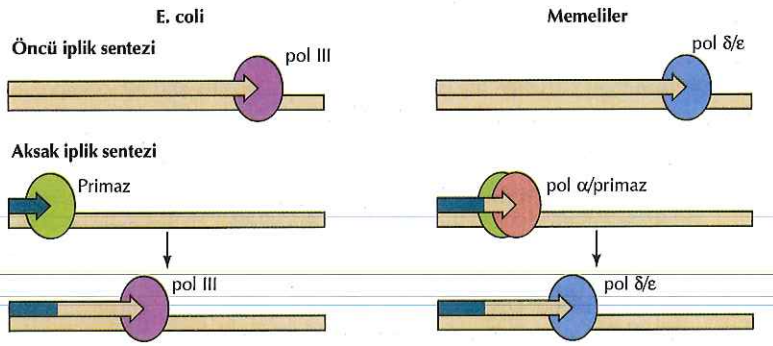


Şekil 5.6 RNA primerlerinin uzaklaştırılması ve Okazaki fragmanlarının birleştirilmesi
DNA polimeraz I, 5'den 3' eksonükleaz aktivitesi sayesinde RNA primerlerini uzaklaştırır ve Okazaki fragmanları arasını DNA ile doldurur. Sonuçta ortaya çıkan DNA parçaları DNA ligaz ile birleştirilirler.



Aksak DNA ipliğinin bütünlenmesi için, sonunda, Okazaki fragmanlarından RNA primerleri çıkarılıp yerine DNA sentezlenmelidir. *E.coli*'de RNA primerleri, RNA-DNA hibridlerinde RNA ipliğini yıkan bir enzim olan **RNaz H** ve polimeraz I'in birlikte etkisi ile uzaklaştırılır. Bu, *E.coli* DNA replikasyonunun, polimeraz I'in kritik rol oynadığı bir bölümüdür. DNA polimeraz aktivitesine ek olarak, polimeraz I, 3'den 5' veya 5'den 3' yönünde DNA (veya RNA)'yı hidrolize edebilen bir **eksonükleaz** olarak davranır. Polimeraz I'in 5'→ 3' eksonükleaz aktivitesi, Okazaki fragmanlarının 5' uçlarından ribonükleotidleri uzaklaştırarak, bunların deoksiribonükleotidlerle yer değiştirmesini ve sadece DNA'dan ibaret fragmanların oluşmasını sağlar (Şekil 5.6). Ökaryot hücrelerde, primerlerin uzaklaştırılmasında *E.coli* polimeraz I'in yerini başka eksonükleazlar alır ve Okazaki fragmanlarının arasındaki boşluk polimeraz δ tarafından doldurulur. Prokaryotlarda olduğu gibi bu DNA parçaları daha sonra DNA ligaz tarafından birleştirilir.

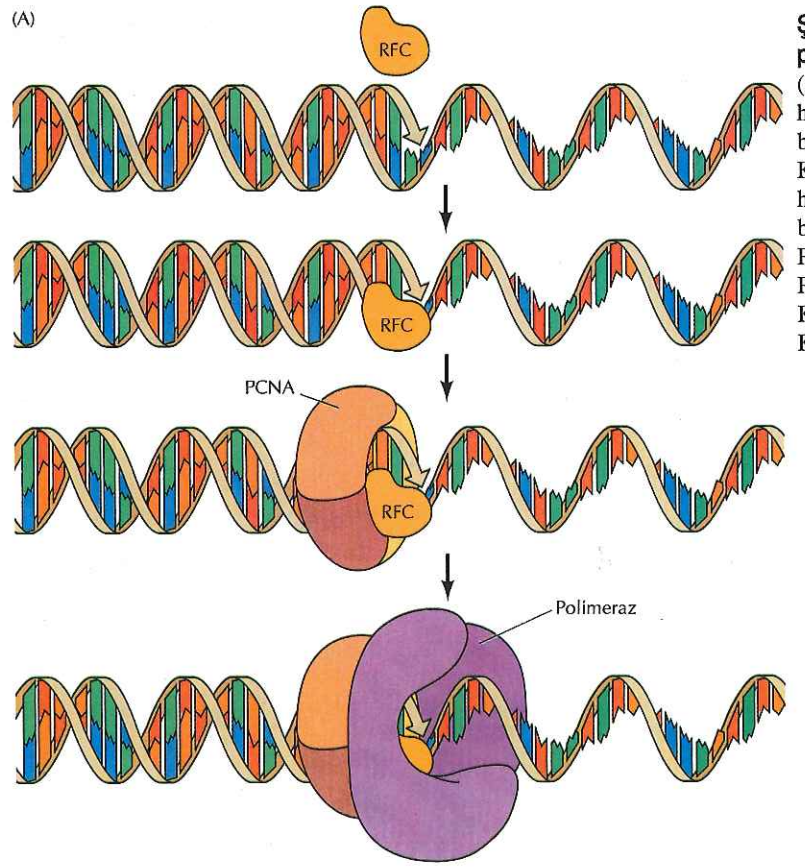
Bu şekilde, replikasyon çatalında farklı DNA polimerazlar farklı roller üstlenirler (Şekil 5.7). Prokaryot hücrelerde polimeraz III asıl replikatif polimerazdır, RNA primerlerinin uzatılması ile Okazaki fragmanlarının ve DNA'nın öncü ipliğinin her ikisinin birden sentezinden sorumludur. Daha sonra polimeraz I, RNA primerlerini uzaklaştırır ve Okazaki fragmanları arasındaki boşlukları doldurur. Ökaryot hücrelerde polimeraz α primaz ile kompleks halde bulunur ve aksak ipliğin sentezi sırasında primaz ile birlikte kısa RNA-DNA parçalarının sentezinde görev aldığı görünmektedir. Polimeraz δ, daha sonra, başlangıçta polimeraz α-primaz kompleksi tarafından sentezlenen RNA-DNA primerleri üzerinden, öncü ve aksak ipliğin her ikisini de sentezleyebilir. Ek olarak, polimeraz δ, primerlerin uzaklaştırılmasının ardından Okazaki fragmanları arasındaki boşlukların doldurulmasında *E.coli*'deki polimeraz I'in yerini alabilir.



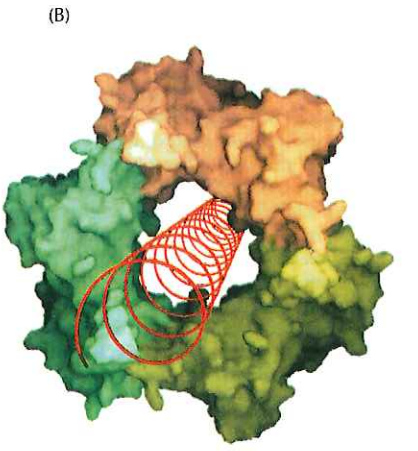
Şekil 5.7 DNA polimerazların *E.coli* ve memeli hücrelerindeki rolleri
Öncü iplik *E.coli*'de polimeraz III (pol III), memeli hücrelerinde polimeraz δ ve ε (pol δ/ε) tarafından sentezlenir. *E.coli*'de aksak iplik sentezi primaz tarafından başlatılır ve RNA primerleri DNA polimeraz III ile uzatılır. Memeli hücrelerinde aksak ipliğin sentezi primaz ile polimeraz α (pol α) kompleksi tarafından başlatılır. Bu kompleks tarafından sentezlenen kısa RNA-DNA parçaları daha sonra polimeraz δ ve ε ile uzatılır.

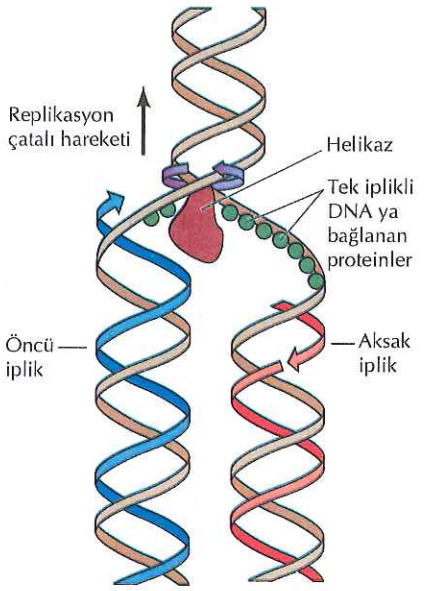
Her ne kadar polimeraz ε'un işlevi tam olarak anlaşılmamışsa da, aktivitesi polimeraz δ'nın kine benzer gözükmektedir.

Replikasyon çatalında, polimerazlar ve primaz dışında başka birkaç protein de görev alır. Bu ek proteinler, DNA replikasyonu hasarlı *E.coli* mutantlarının analizi ve SV40 DNA'sının *in vitro* replikasyonu için gerekli memeli proteinlerinin saflaştırılması ile tanımlanmışlardır. Replikasyon için gerekli proteinlerin bir grubu, DNA polimerazlara bağlanarak polimerazların aktivitelerini artırır ve onların kalıp DNA'ya bağlı kalmalarını sağlayarak, yeni DNA ipliğinin sentezine devam etmesini sağlarlar. *E.coli* polimeraz III ile ökaryot polimeraz δ ve ε'un her ikisi de, polimerazı primer üzerine yerleştiren ve kalıp iplikle kararlı bir bağlantı oluşturmasını sağlayan, iki tip aksesuar



Şekil 5.8 Polimeraz aksesuar proteinleri
(A) Kıskaç yükleyen protein (memeli hücrelerinde RFC), primer ile kalıp bağlantı noktasından DNA'ya bağlanır. Kayan-kıskaç proteini (memeli hücrelerinde PCNA) RFC'nin yanına bağlanır ve DNA polimeraz daha sonra PCNA'ya bağlanır. (B) DNA'ya bağlı PCNA modeli (B, T.S.Krishna, X.P. Kong, S. Gary, P.M. Burgers and J. Kuriyan, 1994. *Cell* 79: 1233.)



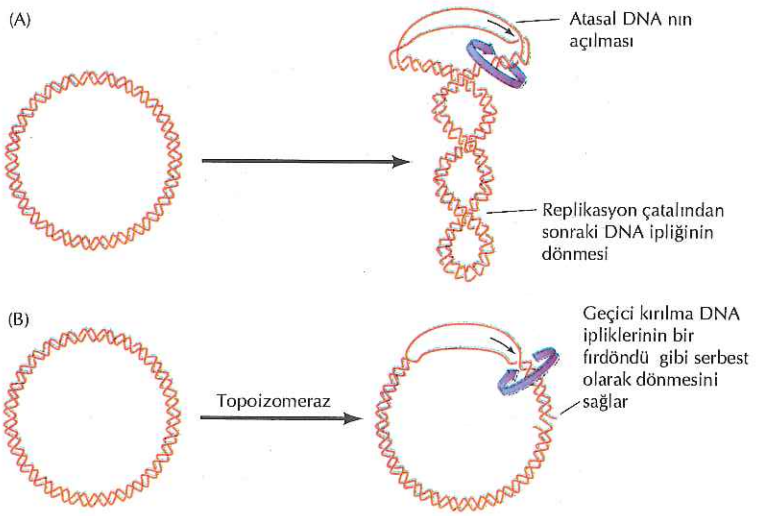


Şekil 5.9 Helikazların ve tek ipliğe bağlanan proteinlerin hareketi
Helikazlar, replikasyon çatalının ilerisinde, atasal DNA ipliklerini açarlar. Açılan DNA iplikleri, daha sonra, yeni DNA'nın sentezine kalıplık yapabilmeleri için tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler sayesinde stabilize edilirler.

proteinle (kayan kıskaç proteinler ve kıskaç yükleyen proteinler) ile ilişkilidirler (Şekil 5.8). Kıskaç yükleyen proteinler (*E.coli*'de γ kompleks ve ökaryotlarda replikasyon faktörü C [RFC] olarak adlandırılırlar) özellikle primer ve kalıp arasındaki bağlantı noktasından DNA'yı tanır ve bağlanırlar. Kayan-kıskaç proteinler (*E.coli*'de β proteini ve ökaryotlarda çoğalan hücre nükleer antijeni [PCNA] olarak adlandırılır) kıskaç-yükleyen proteinlerin yanına bağlanır ve kalıp DNA etrafında bir halka oluşturur. Kayan-kıskaç proteinleri daha sonra, DNA polimerazları, DNA üzerinde primer-kalıp bağlantısına yükler. Kayan-kıskaç tarafından oluşturulan halka, replikasyon ilerlerken polimerazın kalıp ile ilişkisinin korunmasını sağlar ve böylece, binlerce nükleotidlik DNA'nın kesintiye uğramadan sentezlenmesine olanak verir.

Diğer proteinler kalıp DNA'yı açar ve tek iplik bölgelerini sağlamlaştırırlar (Şekil 5.9). **Helikazlar**, replikasyon çatalının ilerisinde ATP yardımı ile atasal DNA'yı açan enzimlerdir. **Tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler** (örn., ökaryot replikasyon faktörü A [RFA]) açılan kalıp DNA'yı sabitler, DNA polimeraz tarafından kopyalanacak şekilde tek iplik halinde kalmasını sağlarlar.

Atasal DNA iplikleri çözüldükçe, replikasyon çatalının ilerisinde DNA dönmeye zorlanır. Bu dönüş, engellenmediği taktirde, çembersel DNA (SV40 DNA'sı veya *E.coli* kromozomu gibi) kendi üzerine kıvrılarak, sonunda replikasyonu durdurur (Şekil 5.10). Bu problem, DNA ipliklerinin geri dönüşümlü olarak kırılıp yeniden bağlanmasını katalizleyen enzimler, **topoizomerazlar** tarafından çözülür. Bu enzimler iki tiptir: Tip I topoizomerazlar DNA'nın sadece tek ipliğini kırarlar; tip II topoizomerazlar her iki iplikte eş zamanlı kırık oluştururlar. Tip I ve II topoizomerazlar tarafından oluşturulan kırıklar bir "fırdöndü" gibi kalıp DNA'nın iki ipliğinin birbirlerinin etrafında serbest bir şekilde dönmesini sağlayarak çatalın ilerisinde DNA'nın kendi üzerine katlanmaları engeller (bkz. Şekil 5.10). Her ne kadar

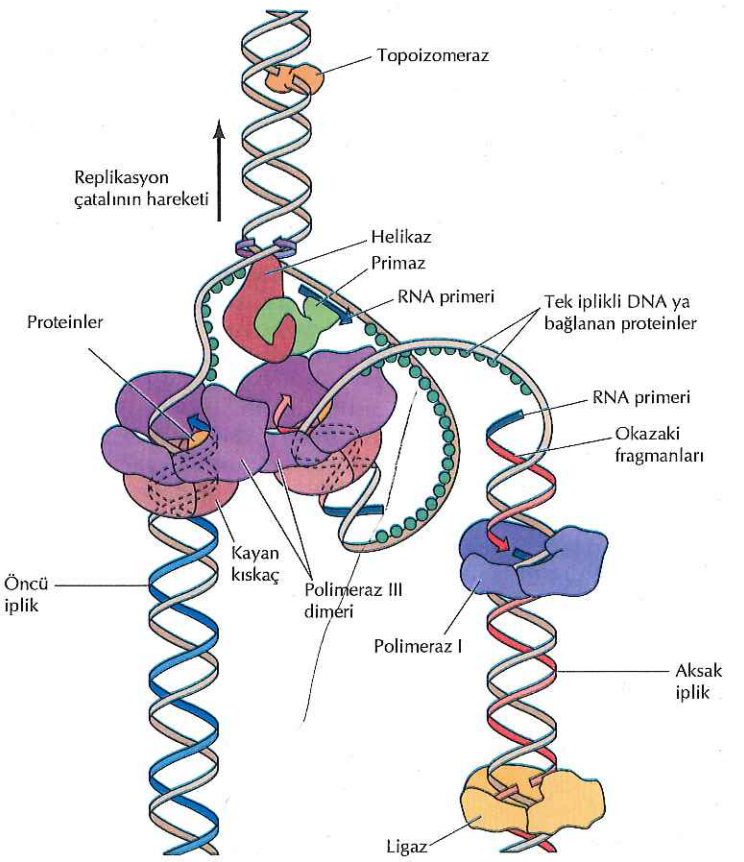


Şekil 5.10 DNA replikasyonu sırasında topoizomerazların rolü
(A) Kalıp DNA'nın iki ipliği açılınca, replikasyon çatalının ilerisinde DNA zıt yönde dönmeye zorlanır ve çembersel moleküllerin kendi üzerlerine katlanmalarına neden olur. (B) Bu problem, DNA ipliklerinin geri dönüşümlü olarak kırılıp yeniden birleşmelerini sağlayan topoizomerazlar tarafından çözülür. Bu enzimler tarafından oluşturulan geçici kırıklar, DNA'nın iki ipliğinin birbirleri etrafında serbestçe dönmesine olanak veren bir fırdöndü gibi rol oynar.

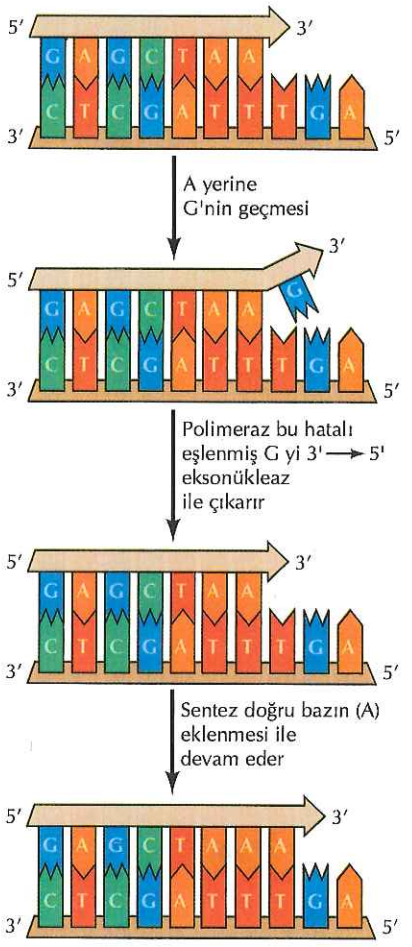
ökaryot kromozomları çembersel değil, doğrusal DNA molekülleri içerse de, replike olmaları topoizomerazları gerektirmektedir; aksi taktirde, DNA sentezi boyunca kromozomların tamamının sürekli olarak dönmesi gerekirdi.

Tip II topoizomeraz sadece DNA'nın açılması için değil, aynı zamanda, birbirinin içine geçmiş olan yeni sentezlenmiş çembersel DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması için de gereklidir. Ökaryot hücrelerde topoizomeraz II'nin mitotik kromozom yoğunlaşmasında gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, maya mutantları ve insan ve *Drosophila* ile yapılan araştırmalar, topoizomeraz II'nin kardeş kromatidlerin mitozda ayrılması için gerekli olduğunu göstermiştir ki bu, ökaryot kromozomlarında yeni sentezlenmiş DNA'nın halkalarının çözülmesinde bu enzimin görevli olabileceğini göstermektedir.

DNA replikasyonunda yer alan enzimler, replikasyon çatalında DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin her ikisini eş zamanlı sentezlemek üzere, işbirliği yaparlar (Şekil 5.11). Bu görev, replikatif DNA polimerazların (*E.coli*'de polimeraz III veya ökaryotlarda polimeraz δ/ε) uygun aksesuar proteinleri ile birlikte, dimerler oluşturmalarıyla başarılır. Polimerazlardan biri öncü ipliği sentezlerken diğeri aksak ipliği sentezlemektedir. Aksak ipliğin kalıbının, replikasyon çatalında bir halka oluşturduğu düşünülmektedir, böylece, aksak ipliğin sentezinden sorumlu polimeraz alt birimi, öncü ipliği sentezleyen diğer alt birim ile aynı yönde hareket edebilir.



Şekil 5.11 *E.coli* replikasyon çatalının şekli
Helikaz, primaz ve iki DNA polimeraz III molekülü DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin her ikisini de, koordine bir biçimde, sentezlerler. Aksak iplik kalıbı, aksak ipliği sentezleyecek olan polimerazın, çatalın genel hareket yönüyle aynı yönde hareket etmesini sağlayacak şekilde katlanır. Topoizomeraz, çatalın ilerisinde çözücü olarak davranırlar ve DNA polimeraz I ile ligaz RNA primerlerini uzaklaştırıp çatalın gerisinde Okazaki fragmanlarını birleştirirler.



Şekil 5.12 DNA polimeraz ile yanlış düzeltme (proofreading)
Kalıp iplikteki T ile hatalı eşleşme sonucunda, A yerine G gelmiştir. Bu, yanlış bir eşleşme olduğundan, 3' ucundaki G kalıp iplikle hidrojen bağı yapamaz. Uzayan zincirin 3' ucundaki bu hatalı eşleşme, DNA polimerazın 3'den 5' eksonükleaz aktivitesi ile tanınır ve çıkarılır. Bunun için, kalıp ipliğe hidrojen bağı ile bağlı bir primer gerekmektedir ki, sentez devam edebilsin. Hatalı eşleşmiş G'nin çıkarılmasından sonra, doğru (A) nükleotidin eklenmesiyle sentez devam eder.

Replikasyonun Doğruluğu

DNA replikasyonunun hatasız olması, hücrenin çoğalma süreci açısından önemlidir ve değişik genler için mutasyon oranı hesapları, replikasyon sırasında hata olasılığının, eklenen her 10^9-10^{10} baz için sadece bir yanlış baz olduğunu göstermiştir. Bu hata frekansı tamamlayıcı baz eşleşmesi temeline bakıldığında, beklenenden çok daha düşüktür. Örnek olarak, doğru eşleşen ve yanlış eşleşen bazlar arasında farklı hidrojen bağı oluşumunun serbest enerji değişikliği, sadece, doğru baz eşleşmesinin oluşumunu yaklaşık 1000 kat fazla destekleyecek kadar büyüktür. Sonuçta, baz seçimi basitçe, tamamlayıcı bazlar arasında hidrojen bağlanması ile baz eşleşmesi açısından değerlendirildiğinde, hata oranı 10^3 bazda birdir. Daha yüksek oranlarda elde edilen doğruluk, büyük oranda DNA polimerazın aktiviteleri ile sağlanmaktadır.

DNA polimerazın replikasyonun doğruluğunun artırma mekanizmalarından biri, yeni sentezlenen DNA'ya eklenecek doğru bazın seçimine yardım etmektir. DNA polimeraz, sadece, kalıp ipliğe hidrojen bağıyla bağlanan herhangi bir nükleotidin eklenmesini katalizlemez. Doğru baz çifti konformasyonuna uyum göstererek, yanlış baz eşleşmesini aktif olarak ayırt eder. Örnek olarak, bazı DNA polimerazlarla yakın zamanda yapılan yapısal analizler, doğru olarak eşleşmiş dNTP'lerin DNA polimerazda yapısal değişiklik uyararak, nükleotidin DNA'ya bağlanmasına yol açtığını göstermiştir. DNA polimerazın, eklemek için, eşleşmiş nükleotidleri seçme yeteneği, replikasyonun doğruluğunu yaklaşık bin kez artırmakta, 10^{-3} olarak beklenen hata olasılığı yaklaşık 10^{-6} ya indirgemektedir.

DNA replikasyonunun doğruluğundan sorumlu bir diğer önemli mekanizma, DNA polimerazın **yanlışını düzeltme** (proofreading) aktivitesidir. Daha önce de açıklandığı gibi, *E.coli* DNA polimeraz I'i, hem 3'den 5' hem de 5'den 3' eksonükleaz aktivitesine sahiptir. Eksonükleaz 5' → 3' aktivitesi DNA sentez yönünde çalışmakta ve Okazaki fragmanlarından RNA primerlerinin uzaklaştırılmasına yardım etmektedir. Eksonükleaz 3' → 5' ise DNA sentezinin ters yönünde çalışmakta ve yeni sentezlenen DNA'nın yanlışının düzeltilmesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 5.12). Yanlış düzeltme, DNA polimeraz, sentezi *de novo* başlatamadığı ve primere gereksindiği için etkilidir. Kalıba hidrojen bağı ile bağlı primerler özellikle kullanılır ki, yanlış bir baz eklendiğinde, sentezi sürdürmek için kullanılmak yerine 3'den 5' eksonükleaz aktivitesi ile uzaklaştırılır. Benzer 3'den 5' eksonükleaz aktivitesi *E.coli* polimeraz III ve ökaryotik DNA polimerazlar δ ve ε'da da bulunmaktadır. Bu polimerazların 3'den 5' eksonükleaz aktiviteleri, uzayan DNA zincirinin sonuna eklenmiş yanlış bazı seçici olarak uzaklaştırır ve böylelikle, replikasyonun doğruluğunu yüz ila bin kez artırır.

Yanlışını düzeltebilme özelliğinin önemliliği, DNA polimerazların primerlere gereksinmelerini ve DNA ipliğini, yalnızca, 5'den 3' yönünde katalizlemeleri gerçeğini açıklayabilir. DNA 5'den 3' yönünde sentezlendiğinde, polimerleşme için gerekli enerji, uzayan zincirin 3' hidroksil grubuna eklenen serbest dNTP'nin 5' trifosfat grubunun hidrolizinden elde edilmektedir (bkz. Şekil 5.12). Eğer DNA 3'den 5' yönünde uzuyor olsaydı, polimerleşme enerjisi, DNA'ya halihazırda eklenmiş olan son nükleotidin 5' trifosfat grubunun hidrolizinden elde edilecekti. Bu durum, yanlış eklenmiş son nükleotidin uzaklaştırılması, zincirin uzaması için gerekli olan 5'

trifosfat grubunun da uzaklaştırılmasına neden olacağından, yanlışın düzeltilme olasılığını ortadan kaldıracaktı. Böylelikle, her ne kadar DNA polimerazın, primeri yalnızca 5'den 3' yönünde uzatabilmesi replikasyonu karmaşık bir süreç haline getiriyorsa da, genetik materyalin doğru replikasyonunu garantilemek için gereklidir.

Yanlış eşleşmiş bazı algılayabilme özelliğiyle birlikte, DNA polimerazların yanlışlarını düzeltme aktiviteleri, replikasyonun hata olasılığını 10^9 bazda bir yanlış baz olacak şekilde indirgemek için yeterlidir. Yeni sentezlenmiş DNA'ya eklenmiş olan yanlış eşleşmiş bazların uzaklaştırılmasını sağlayan ek mekanizmalar ("DNA onarım" bölümünde tartışıldı) genetik bilginin doğru kopyalanmasını daha fazla garantilemektedir.

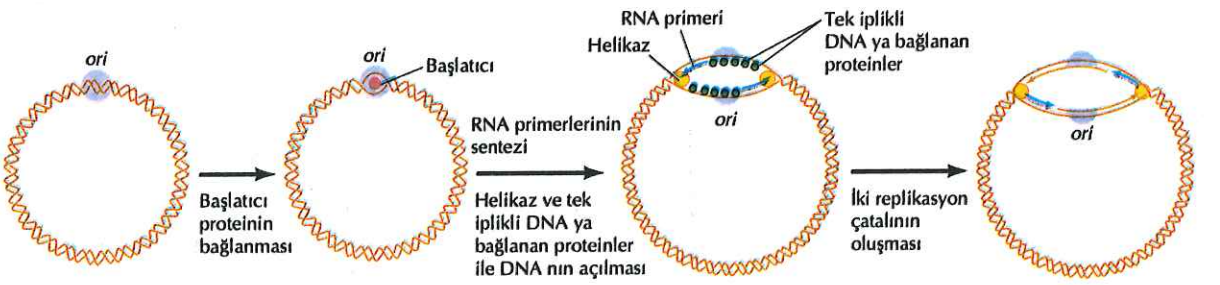
Başlangıç Noktaları (orijin) ve Replikasyonun Başlaması

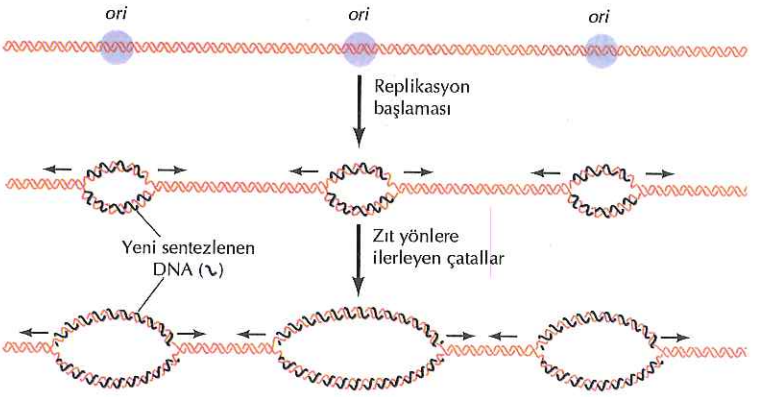
Hem prokaryot hem ökaryot DNA'larının replikasyonu **replikasyon orijini** olarak adlandırılan ve replikasyon sürecini başlatan proteinler için özgül bağlanma bölgesi sunan özel dizilerden başlar. *E.coli*'de tanımlanmış ilk orijinde yapılan genetik analizler, bakteriyel kromozomda replikasyonun her zaman tek bir bölgeden başladığını göstermiştir. O zamandan beri, *E. coli* orijini detayları ile incelenmiş ve DNA replikasyonunu başlatmak için gerekli proteinlerin bağlandığı, 245 baz çiftlik DNA'dan oluştuğu bulunmuştur (Şekil 5.13). En önemli aşama, orijin içerisindeki özgül DNA dizinine, başlatıcı proteininin bağlanmasıdır. Başlatıcı protein DNA orijinini açmaya başlar ve DNA sentezi için gerekli diğer proteinleri bölgeye çağırır. Helikaz ve tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler, kalıp DNA'yı açmak için çözmeye devam ederler ve primaz öncü ipliğin sentezini başlatır. İki replikasyon çatalı oluşur ve çembersel *E.coli* kromozomu boyunca zıt yönlü olarak hareket eder.

SV40 gibi bazı hayvan viruslarının replikasyon orijinleri, ökaryotlarda DNA sentezinin başlaması için model olarak incelenmiştir. SV40, hem enfekte hücrelerde hem de hücresiz sistemlerde işlevsel olan, tek bir replikasyon orijinine (64 baz çiftinden oluşan) sahiptir. Replikasyon, virüs tarafından kodlanan ve orijine bağlanıp helikaz olarak da görev yapabilen bir protein (T antijen olarak adlandırılır) ile başlatılır. Açılmış kalıbı sabitlemek için bir, tek iplik DNA'ya bağlanan protein, gereklidir ve daha sonra, DNA polimeraz α-primaz kompleksi DNA sentezini başlatır.

Her ne kadar tek bir orijin, viral ve bakteriyel genomun replikasyonu için yeterli ise de, ökaryotik hücrelerin çok daha büyük genomunun, makul bir zaman içerisinde replikasyonu çok sayıda orijin gerektirmektedir. Örneğin, *E.coli*'nin tüm genomu ($4x10^6$ baz çifti) yaklaşık olarak 30 dakikada, tek bir orijinden başlayarak kopyalanabilir. Eğer memeli genomları ($3x10^9$ baz çifti) aynı hızda ve tek bir replikasyon orijininden replike olsaydı, DNA'nın kopyalanması

Şekil 5.13 *E.coli*'de replikasyon orijini
E.coli kromozomunda replikasyon, orijin (*ori*) olarak tanımlanan, tek bir bölgeden başlar. İlk olay, kalıbın kısmen açılmasını sağlayan bir başlatıcı proteinin ori DNA'ya bağlanmasıdır. Helikaz ve tek iplik DNA'ya bağlanan proteinlerin etkisi ile DNA çözülmesi devam eder ve primaz tarafından RNA primerleri sentezlenir. Orijinde oluşan iki replikasyon çatalı çembersel DNA molekülünde zıt yönlere doğru hareket ederler.





Şekil 5.14 Ökaryot kromozomlarında replikasyon orijinleri
Replikasyon, her biri iki replikasyon çatalı oluşturan çok sayıda orijinde (*ori*) başlar.

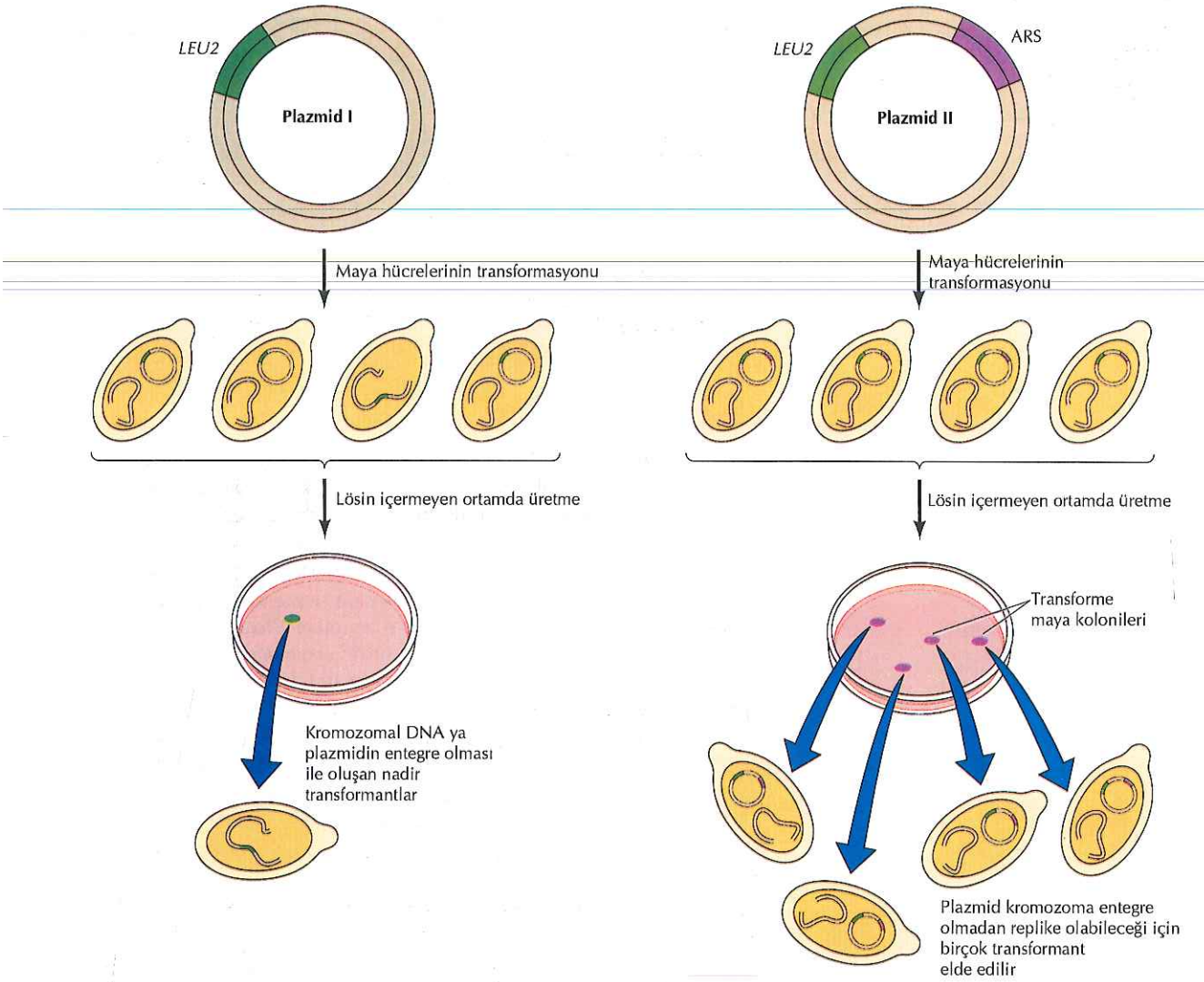
için yaklaşık 3 hafta (30,000 dakika) gerekli olacaktı. Problem, memeli hücrelerinde DNA replikasyonunun hızının, olasılıkla ökaryot DNA'nın kromatine paketlenmesinden dolayı, *E. coli*'dekinden on kez daha yavaş olmasıyla daha da ağırlaşmaktadır. Yine de, memeli hücrelerin genomları tipik olarak birkaç saat içerisinde replike olmaktadır ve bunun için binlerce replikasyon orijini gerekmektedir.

Ökaryot hücrelerde çok sayıda replikasyon orijininin varlığı ilk kez, değişik zaman aralıklarında radyoaktif timidin ile muamele edilen hücre kültürlerinde, yeni sentezlenen DNA'nın otoradyografi ile görüntülenmesiyle belirlendi. Benzer çalışmaların sonuçları, DNA sentezinin bir çok bölgede başladığını ve kromozom boyunca her iki yönde devam ettiğini gösterdi (Şekil 5.14). Memeli hücrelerindeki replikasyon orijinlerinin birbirlerinden uzaklıkları yaklaşık 50 ila 300 kb dır ve bu, insan genomunda 30,000 replikasyon orijininin var olduğu anlamına gelir. Daha basit ökaryotların genomlarında da çok sayıda orijin bulunur; örneğin, mayalarda replikasyon, yaklaşık olarak 40 kb aralıklı orijinlerden başlar.

Ökaryot kromozomlarının replikasyon orijinleri ilk olarak *S. cerevisiae* da çalışılmış ve transforme edilen hücrelerde plasmidlerin replikasyonunu sağlayan diziler olarak tanımlanmışlardır (Şekil 5.15). Bu, dizilerin işlevsel analizine olanak sağlamış ve böyle birkaç öğe (**bağımsız replike olabilen diziler** veya **ARS** olarak adlandırılan) ayrımlanmıştır. Replikasyon orijini olarak rolleri, yalnız plazmidlerde değil maya kromozomal DNA'sında da direkt biyokimyasal incelemelerle doğrulanmıştır.

Fonksiyonel ARS öğeleri, farklı ARS'ler için ortak olan 11 baz-çiftlik çekirdek diziyi de kapsayan, 100 baz çifti uzunlukta bölgeyi kaplar (Şekil 5.16). Bu çekirdek dizi, ARS fonksiyonu için şarttır ve *S.cerevisiae* orijinlerinde DNA replikasyonunun başlaması için gerekli olan bir protein kompleksin (**orijin replikasyon kompleksi** veya **ORC**) bağlanma bölgesi olduğu anlaşılmıştır. ORC kompleksinin, diğer proteinleri (DNA helikaz dahil) orijin noktasına çağırarak replikasyon başlamasına öncülük ettiği görülmektedir. *S. cerevisiae*'da DNA replikasyonunun başlama mekanizması, başlatıcı proteinin orijin dizinine özgül bağlanmasıyla, prokaryottakine ve ökaryot viruslardakine benzerlik göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalar, ORC proteinlerinin replikasyon başlatıcısı olarak rolünün, mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda korunmuştur. Bununla birlikte, diğer ökaryotlardaki replikasyon orijinleri, *S. cerevisiae*'nın ARS elemanlarından çok daha az tanımlanmıştır. Bölünen maya *S. pompe*'de orijin dizinleri, DNA'da

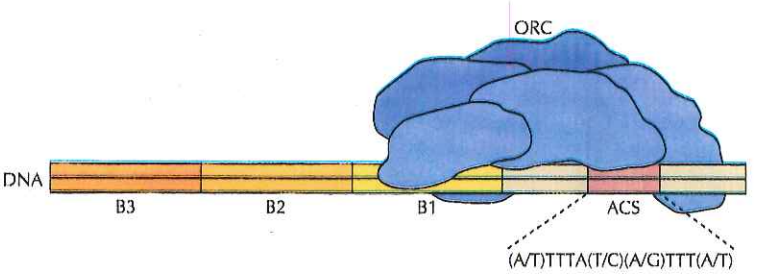


Şekil 5.15 Mayalarda replikasyon orijinlerinin tanımlanması
Plazmid I ve II'nin her ikisi de, lösin içermeyen ortamda transforme hücrelerin çoğalmasını sağlayan, seçilebilir bir marker gen (*LEU2*) barındırmaktadır. Ancak, sadece plazmid II, bir replikasyon orijini (ARS) içermektedir. Mayaların plazmid I ile transformasyonu, plazmidlerin kromozomal DNA'ya katıldığı, nadir transformantlar üretir. Bununla birlikte, plasmid II maya kromozomuna katılmadan da replike olabildiğinden (bağımsız replikasyon), birçok transformant maya hücresi elde edilebilmektedir.

1 kb kadar bir bölgeyi kaplar. *S. pompe* orijinleri, *S. cerevisiae*'nın ARS elemanlarının iyi tanımlanmış ORC bağlanma bölgelerini içermez ancak, *S. pompe* ORC kompleksi için bağlanma bölgesi olarak görev yaptığı anlaşılan, AT-zengin dizi tekrarları içermektedir. Bir kaç ORC bağlanma bölgesi barındıran ve 2kb den geniş bir DNA bölgesini kapsayan bir *Drosophila* replikasyon orijini bulunmuş, fakat bu diziler tanımlanmamıştır. Memelilerde bazı orijinler birkaç kb DNA bölgesinde lokalize edilmiştir. Diğer durumlarda, replikasyon 10 ile 50 kb bir alanda yayılan, geniş "başlangıç bölgeleri" içerisindeki birçok orijinde başlayabilir. Görülmektedir ki, replikasyon orijini olarak tanımlanan diziler ökaryotlarda geniş bir dağılım göstermekte, ancak ORC proteinlerinin replikasyon başlatıcısı olarak rolleri korunmaktadır.

Telomerler ve Telomeraz: Kromozom Uçlarının Replikasyonu

DNA polimerazlar, primerleri sadece 5'den 3' yönünde uzattıkları için, doğrusal DNA moleküllerinin 5' uçları kopyalanamaz. Sonuç olarak, ökaryot hücrelerin doğrusal kromozomlarının uç dizilerinin replikasyonu için özel mekanizmalara ihtiyaç vardır. Bu diziler



Şekil 5.16 Bir maya ARS elemanı
Eleman, 11 baz çiftlik, orijin replikasyon kompleksi (ORC) için özgül bağlanma bölgesi olan bir ARS konsensus dizisi (ACS) barındırmaktadır. Diğer üç öğe (B1, B2 ve B3) bireysel olarak gerekli olmasalar da, birlikte ARS fonksiyonuna katkıda bulunurlar.

(telomerler), basit DNA dizisi ardışık tekrarlarını içerirler (bkz. Bölüm 4). Bunlar, sentezlerini DNA kalıbı olmaksızın katalizleyerek telomerleri koruyan, **telomeraz** olarak adlandırılan nadir bir enzim sayesinde replike olurlar.

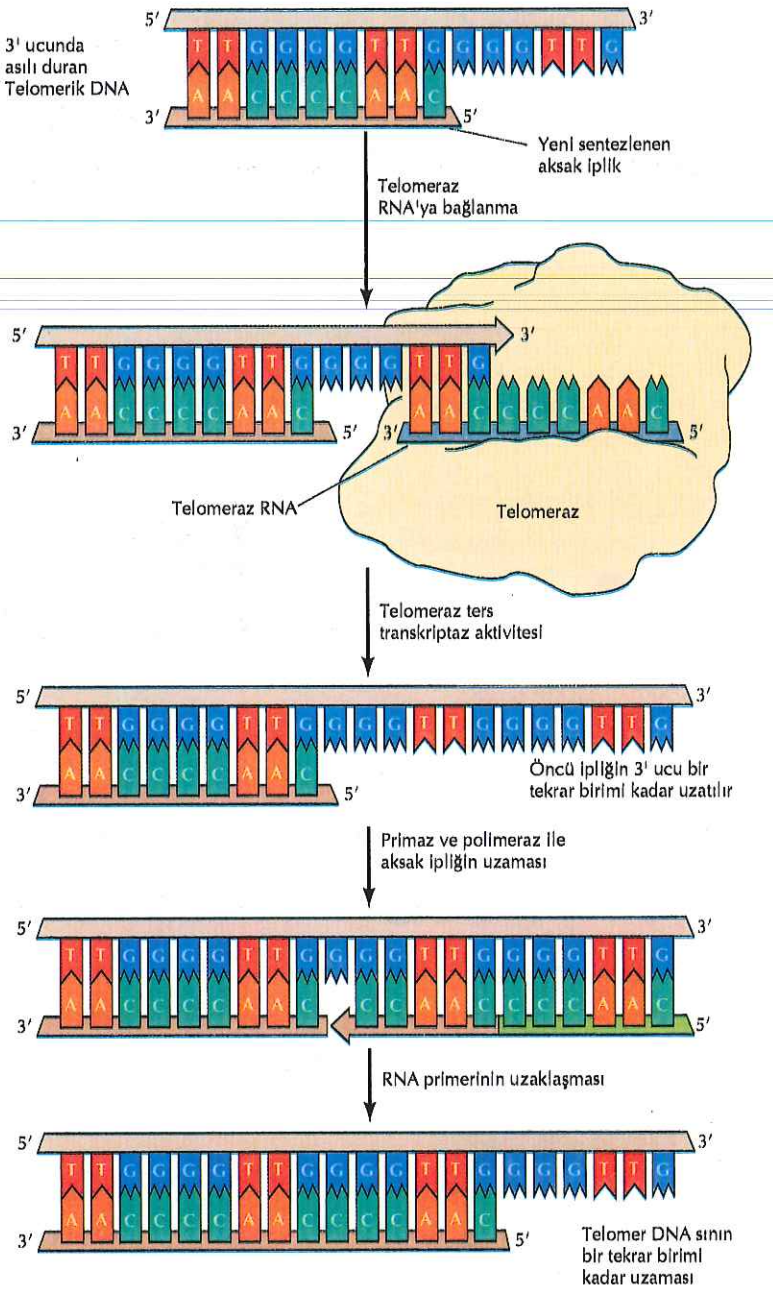
Telomeraz, ilk olarak retrovirus'larda (bkz. Bölüm 3) keşfedilen ve RNA kalıbından DNA sentezleyen bir DNA polimeraz türü olan, **ters transkriptaz**dır. Telomerazın, uç tekrar dizilerine tamamlayıcı olan kendi kalıp RNA'sını, enzim kompleksinin bir parçası olarak, taşıması önemlidir. Bu RNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla telomeraz, uç tekrar dizilerin çoklu kopyasını oluşturabilmekte ve böylelikle, geleneksel şekilde bir DNA kalıbı kullanmadan telomerleri korumaktadır.

Telomeraz etki mekanizması, 1985 yılında Carol Greider ve Elizabeth Blackburn'un, protozoa *Tetrahymena* üzerinde yapmış oldukları çalışmalar ile ilk kez aydınlatılmıştır (Şekil 5.17). *Tetrahymena* telomerazı 3'-AACCCCAAC-5' dizisini barındıran 159 nükleotid uzunluğunda bir RNA ile kompleks yapmıştır. Bu dizi, *Tetrahymena* uç tekrarının (5'-TTGGGG-3') tamamlayıcısıdır ve telomerik DNA'nın sentezi için kalıp olarak görev yapar. Telomerazın bu RNA'yı kalıp olarak kullanarak, kromozomal DNA'nın 3' ucunu orijinal uzunluğunun bir birim ötesine uzatır. Daha sonra tamamlayıcı iplik, polimeraz-α primaz kompleksi tarafından, geleneksel RNA primeri kullanılarak sentezlenebilir. RNA primerin uzaklaştırılması, kromozomal DNA'da çıkıntılı bir 3' ucu bırakır ki bu, ökaryotik kromozomlarının uçlarında halkalar oluşturur (bkz. Şekil 4.22).

Telomeraz bir çok ökaryotda tanımlanmış ve telomeraz RNA'sını kodlayan genler *Tetrahymena*, mayalar, fareler ve insanlarda klonlanmıştır. Her birinde, telomeraz RNA'sı o organizmanın telomerik tekrar dizilerine tamamlayıcı diziler barındırmaktadır (bkz.Tablo 4.4). Hatta, mayalara, mutant telomeraz RNA genleri eklendiğinde, kromozomal telomerik tekrar dizilerinin değişimi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Bu da, ökaryot kromozomlarının uçlarının korunmasında telomerazların etkisinin direkt göstergesidir.

DNA Onarımı

DNA, herhangi bir diğer molekül gibi, çeşitli kimyasal tepkimelere uğrayabilir. Hücre genomunun kalıcı tek kopyasını oluşturması



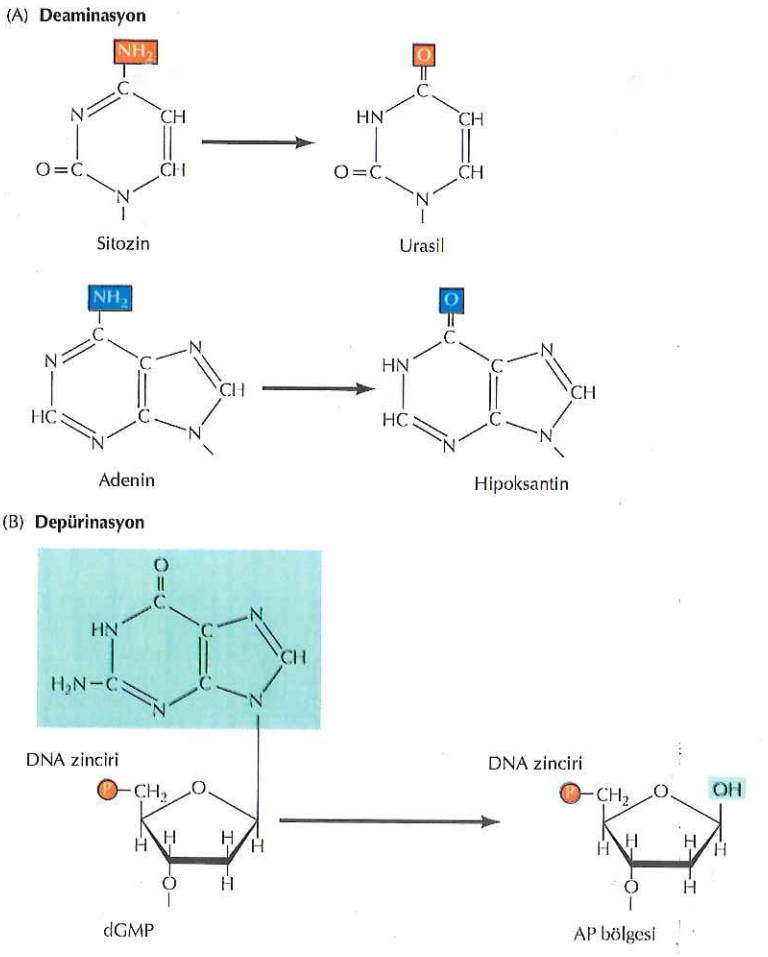
Şekil 5.17 Telomeraz etkisi
Telomerik DNA, yeni sentezlenmiş öncü ipliğin 3' ucunda uzantı şeklinde bulunan, basit bir tekrar dizinidir. Telomeraz, telomerik DNA'ya tamamlayıcı ve enzim kompleksinin bir parçası olarak, kendine ait bir RNA molekülü taşır. Telomerik DNA'nın çıkıntılı ucu, öncü ipliğin bir tekrar birimi kadar uzaması için kalıp görevi yapacak olan telomeraz RNA'sına bağlanır. Telomerik DNA'nın aksak ipliği, daha sonra, geleneksel RNA primeri oluşturma ve DNA polimeraz aktivitesi ile uzatılır.

nedeniyle, DNA'nın yapısındaki değişiklikler, hücrenin RNA'lar ve proteinler gibi diğer bileşenlerindeki değişimlerinden çok daha önemli sonuçlar doğurur. Mutasyonlar, DNA replikasyonu sürecinde yanlış bazın eklenmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, DNA'da çeşitli kimyasal değişimler ya kendiliğinden (Şekil 5.18), ya da radyasyona veya kimyasallara maruz kalmanın bir sonucu olarak (Şekil 5.19) ortaya çıkar. DNA'daki bu gibi hasarlar transkripsiyon ya da replikasyonu

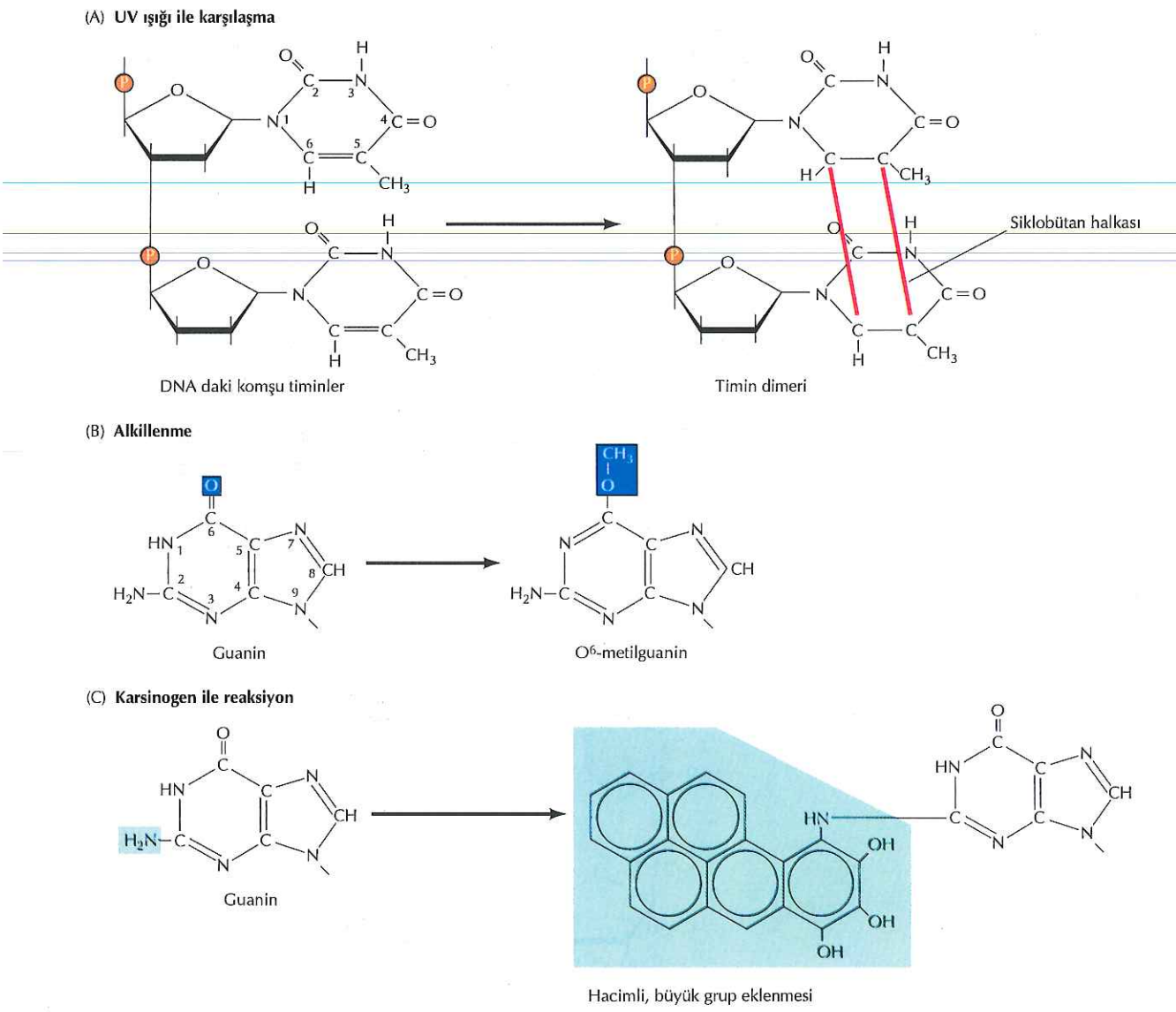
durdurabilir ve yüksek sıklıkta mutasyonla sonlanabilir, bunlar, hücre çoğalması açısından kabul edilemez sonuçlardır. Hücreler, genomlarının bütünlüğünü korumak için, hasarlı DNA'yı onaran mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu DNA onarım mekanizmaları iki ana gruba ayrılabilir: (1) DNA hasarını oluşturan kimyasal reaksiyonun doğrudan tersine çevrilmesi ve (2) hasarlı bazların yeni sentezlenen DNA ile değiştirilmesi. DNA onarımının çalışmadığı noktalarda ise, hücrelerin hasarla başa çıkabilmesi için ek mekanizmalar gelişmiştir.

DNA Hasarının Doğrudan Geri Döndürülmesi

DNA'da oluşan birçok hasar, hasarlı bazların uzaklaştırılmasının ardından, çıkarılan bölgenin yeniden sentezlenmesi ile onarılır. Bununla birlikte, DNA'da bazı hatalar, direk olarak, hasarın geri döndürülmesi ile onarılabilir ki bu, sık görülen, özgül DNA hasarları için etkin bir yol olabilir. Sadece bir kaç tip DNA hasarı, özellikle, morötesi (UV) ışığa maruz kalınmasıyla oluşan pirimidin dimerleri ve pürin halkasına O^6 pozisyonundan metil veya etil gruplarının eklenmesiyle değişime uğramış, alkillenmiş guaninler, bu yolla onarılır.

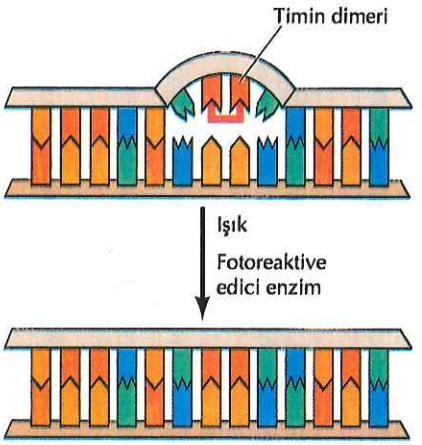


Şekil 5.18 Spontan DNA hasarı
Spontan DNA hasarının iki majör tipi vardır: (A) adenin, sitozin ve guanin deaminasyonu ve (B) pürin bazları ile deoksiriboz arasındaki bağın kopmasından kaynaklanan ve DNA'da pürinsiz (AP) bölgesi bırakan depürinasyon (pürin baz kaybı). dGMP= deoksiguanozin monofosfat.



UV ışını, DNA hasarının oluşumunda en öncelikli kaynaklardan birisidir ve onarım mekanizmaları bağlamında en detaylı araştırılmış olan DNA hasar şeklidir. Güneş ışığının insanlarda hemen, hemen tüm deri kanserlerinin nedeni olması, bunun öneminin bir göstergesidir. UV ışını ile uyarılan en yaygın DNA hasarı, aynı DNA ipliği üzerindeki komşu iki pirimidinin 5 ve 6 ncı karbonları arasındaki çift bağın doyurulması sonucunda, iki pirimidinin siklobütan halkasıyla birleşmesi ile oluşan **pirimidin dimerleridir** (bkz. Şekil 5.19A). Bu dimerlerin oluşumu, DNA zincirinin yapısında biçim bozukluklarına neden olur ve hasarlı bölgeyi geçerken replikasyon ve transkripsiyonu durdurur, bu nedenle, onarılmaları, hücrenin UV ışınımına karşı dayanıklılığı ile yakından ilişkilidir. UV ile uyarılan pirimidin dimerlerinin onarım mekanizmalarından biri, dimerizasyon reaksiyonunun direkt olarak geri dönüştürülmesidir. Siklobütan halka yapısının kırılması için gerekli olan enerji görünür ışıktan sağlandığı

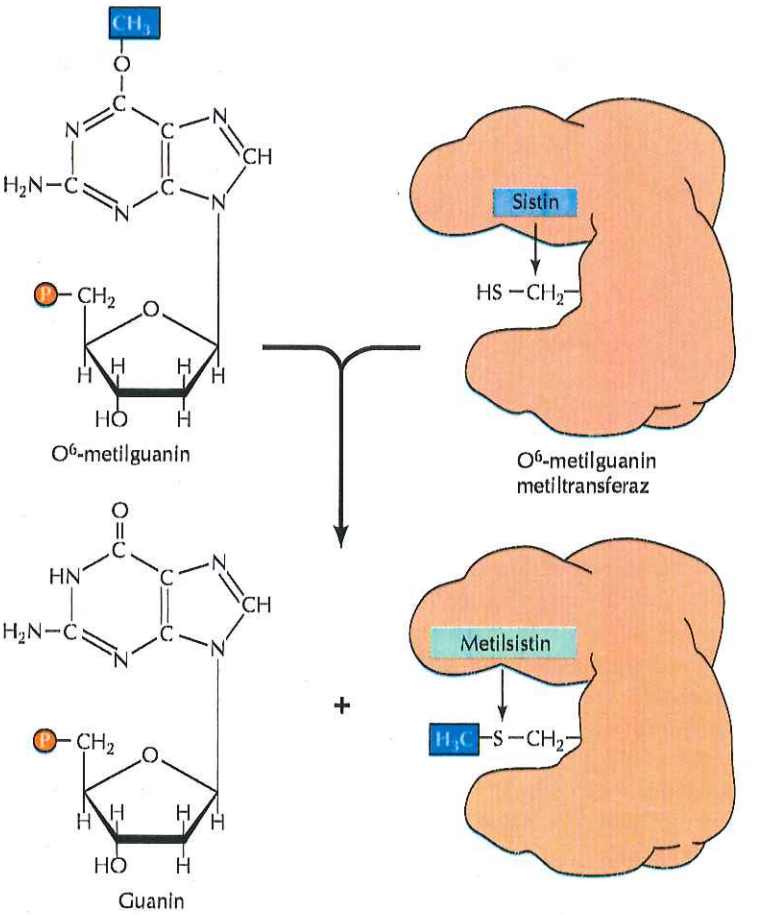
Şekil 5.19 Radyasyon ve kimyasallarla uyarılan DNA hasar örnekleri
(A) UV ışığı, komşu pirimidinlerin (örn., timinler) siklobütan halkasıyla birleştiği pirimidin dimeri oluşumunu indükler. (B) Alkillenme, DNA bazlarına değişik pozisyonlarda metil veya etil gruplarının eklenmesidir. Bu örnekte guaninin O^6 pozisyonundan alkillenmesi ile O^6-metil guanin oluşur. (C) Bir çok karsinojen (örn., benzo-(α)piren) DNA bazları ile reaksiyona girerek, DNA molekülüne büyük, hacimli kimyasal gruplar ekler.



Şekil 5.20 Timin dimerlerinin direkt onarımı
UV ile uyarılan pirimidin dimerleri, görünür ışık enerjisi siklobütan halkasının açılması için kullanılarak, fotoreaktivasyon ile onarılabilir.

için, bu süreç **fotoreaktivasyon** olarak adlandırılır (Şekil 5.20). Normal yapılarına döndürülmüş olan orijinal pirimidin bazları DNA'da kalır. Güneş'ten gelen UV ışınının farklı hücrelerde başlıca DNA hasar nedeni olmasından bekleneceği gibi, pirimidin dimerlerinin fotoreaktivasyon ile uzaklaştırılması, *E.coli*, maya ve bazı bitki ve hayvan türleri gibi, çeşitli prokaryot ve ökaryot canlılarda ortaktır. Bununla birlikte, fotoreaktivasyon genellenemez; birçok tür (insan dahil) bu DNA onarım mekanizmasına sahip değildir.

Diğer bir direkt onarım şekli, alkilleyici ajanlarla DNA arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan hasarlar üzerinde etkilidir. Alkilleyici ajanlar, DNA bazlarına metil veya etil gruplarını aktararak DNA bazını kimyasal olarak değiştiren reaktif bileşiklerdir (bkz. Şekil 5.19B). O^6-metil guanin, sitozin yerine timin ile baz çifti oluşturduğundan guaninin O^6 pozisyonundan metillenmesi özellikle önemli bir hasardır. Bu hasar, O^6-metilguanindeki metil grubunu, kendi aktif merkezinde bulunan bir sistine aktaran bir enzim (O^6-metilguanin metiltransferaz olarak adlandırılır) ile onarılabilir (Şekil 5.21). Böylelikle, potansiyel mutajenik kimyasal değişim uzaklaştırılır ve orijinal guanin onarılmış olur. Bu direkt onarım reaksiyonunu katalizleyen enzimler, insanlar dahil ökaryot ve prokaryotlarda yaygındır.



Şekil 5.21 O^6-metil guaninin onarımı
O^6- metil guanin metiltransferaz, metil grubunu O^6-metil grubundan çıkartarak, enzimin aktif merkezinde yer alan bir sistine aktarır.

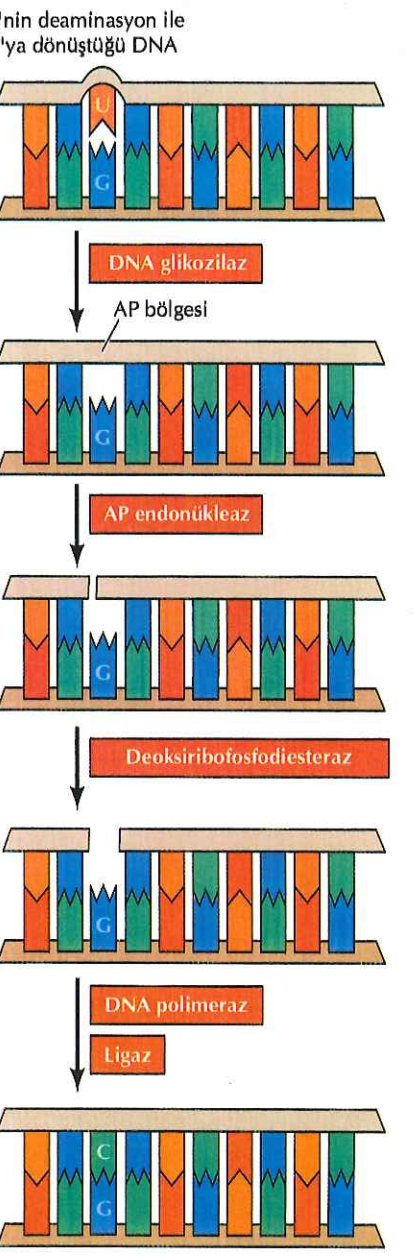
Kesip Çıkararak (Eksizyon) Onarım

Her ne kadar direk onarım özel tip DNA hasarlarının onarımında etkin bir yol ise de, kesip çıkararak onarım DNA'daki birçok kimyasal değişimin onarımı için daha genel bir mekanizmadır. Sonuç olarak, kesip-çıkararak onarımın değişik tipleri prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisi için de en önemli DNA onarım mekanizmasıdır. Kesip çıkararak onarımda hasarlı DNA tanınır ve serbest baz ya da nükleotidler halinde çıkarılır. Oluşan boşluk, hasarlanmamış tamamlayıcı iplik kalıp olarak kullanılarak sentezlenen yeni bir DNA ipliği ile doldurulur. Üç çeşit kesip çıkararak onarım tipi – baz çıkarma, nükleotid çıkarma ve hatalı eşleşme onarımı- hücrelerin değişik tipteki DNA hasarlarının üstesinden gelebilmelerini sağlar.

Urasil içeren DNA'nın onarımı, hasarlı tek bazların tanınarak DNA molekülünden uzaklaştırıldığı **baz-çıkarma onarımı** için iyi bir örnektir (Şekil 5.22). DNA'da urasil iki mekanizma ile ortaya çıkar: (1) Urasil (dUTP [deoksiüridin trifosfat] olarak) DNA sentezi sırasında nadiren timinin yerine katılabilir ve (2) urasil DNA'da sitozinin deaminasyonu ile oluşabilir (bkz. Şekil 5.18A). İkinci mekanizma, tamamlayıcı baz eşleşme düzenini değiştirmesi ve böylece mutajenik bir etki göstermesi nedeniyle, biyolojik olarak çok daha büyük önem taşır. DNA'daki urasil, DNA omurgasındaki deoksiriboz ile baz (urasil) arasındaki bağı koparan **DNA glikozilaz** tarafından çıkarılır. Bu reaksiyonun ürünleri, serbest urasil ve apirimidinik- baz taşımayan şeker- bölgesidir. DNA glikozilaz ayrıca; adeninin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin, pirimidin dimerleri, O^6 metil guanin dışındaki alkillenmiş pürinleri ve oksidasyon veya iyonize radyasyon ile hasarlanan bazlar gibi, diğer normal olmayan bazları da tanır ve uzaklaştırır.

DNA glikozilaz etkinliğinin sonucu, DNA'da apirimidinik veya apürinik (genellikle AP bölgesi olarak adlandırılır) bir bölgenin oluşmasıdır. Benzer AP bölgeleri, normal hücresel koşullarda önemli oranlarda meydana gelen, spontan pürin bazı kaybı sonucunda da ortaya çıkar (bkz. Şekil 5.18 B). Örneğin, insan vücudundaki her hücrenin, her gün birkaç bin pürin bazını kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu bölgeler, komşu AP bölgesini kesen **AP endonükleaz** tarafından onarılır (bkz. Şekil 5.22). Geride kalan deoksiriboz kısmı uzaklaştırılır ve oluşan tek bazlık boşluk DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur.

DNA glikozilazlar sadece spesifik hasarlı baz tiplerini tanıdığı halde, diğer kesip-çıkararak onarım sistemleri DNA molekülünü çarpıtan, UV ile indüklenmiş pirimidin dimerleri gibi çeşitli hatalı bazları ve DNA ile bir çok karsinojenin etkileşimi sonucu DNA'ya eklenen büyük kitleler gibi geniş çeşitlilikte hasarları tanırlar (bkz. Şekil 5.19C). Hasarlı bazların (örn., timin dimerleri), lezyonu içeren oligonükleotidle birlikte uzaklaştırılması nedeniyle, bu yaygın DNA onarım formu, **nükleotid-çıkarma onarımı** olarak bilinir (Şekil 5.23).

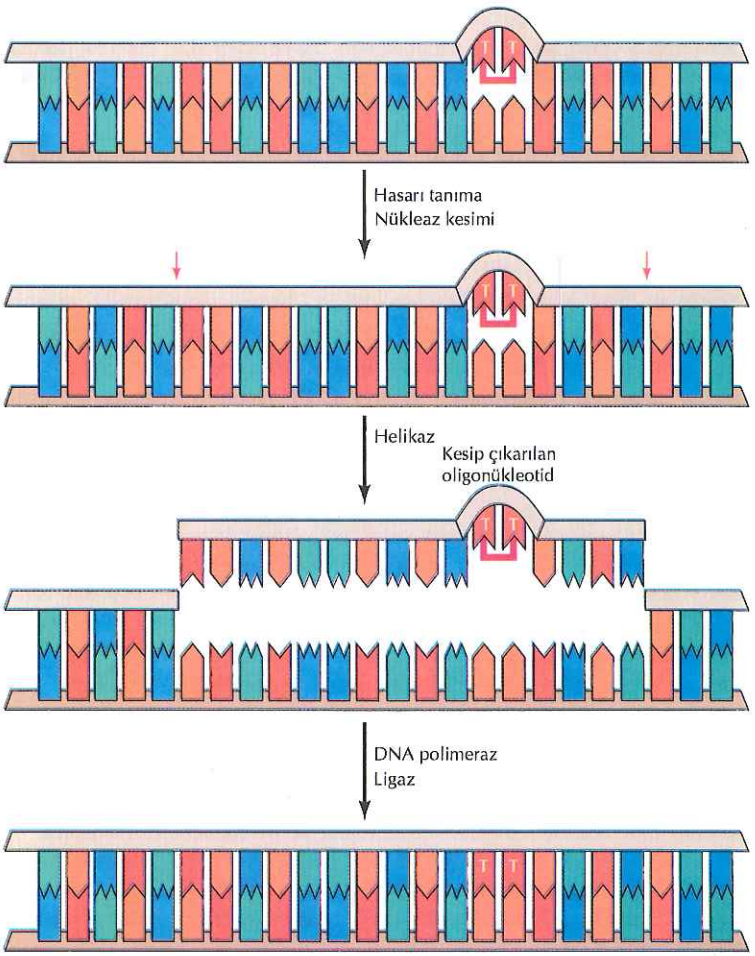


Şekil 5.22 Baz çıkarma onarımı

Bu örnekte urasil, sitozinin deaminasyonu ile oluşmuştur ve DNA'nın tamamlayıcı ipliğinde guaninin karşısındadır. Urasil ve deoksiriboz arasındaki bağ DNA glikozilaz ile, DNA'da bazsız bir deoksiriboz (AP bölgesi) bırakarak kesilir. Bu nokta, DNA zincirini kesen AP endonükleaz tarafından tanınır. Kalan deoksiriboz deoksiribozfosfodiesteraz ile uzaklaştırılır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanarak, G'nin karşısına doğru bazın (C) girmesi sağlanır.

E.coli'de nükleotid çıkarma onarımı, mutasyonları aşırı UV ışığı duyarlılığına neden olan üç genin (*uvrA*, *B* ve *C*) ürünleri tarafından katalizlenir. UvrA proteini hasarlı DNA'yı tanır ve UvrB ile UvrC yi bu bozuk bölgeye sürükler. Daha sonra, UvrB ve UvrC hasarlı bölgeyi, sırasıyla, 3' ve 5' taraflarından keserek, 12 ila 13 bazlık bir oligonükleotid çıkarırlar. UvrABC kompleksi, direk olarak bir oligonükleotidi çıkarabilme özelliğinden dolayı, genellikle **eksinükleaz** olarak adlandırılır. Daha sonra, hasar içeren oligonükleotidin çift iplikli DNA molekülünden uzaklaştırılması için helikaz aktivitesi gerekir ve oluşan boşluk DNA polimeraz I ile doldurulur, ligaz ile uçlar bağlanır.

Nükleotid çıkarma onarım sistemi, maya, kemirgen ve insanları da kapsayan ökaryotlarda kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Mayalarda, *E.coli*'de olduğu gibi, DNA onarımıyla ilişkili birkaç gen (*rad*yasyon duyarlılığı nedeniyle RAD genleri olarak adlandırılır), UV ışığına aşırı duyarlı mutantların izolasyonu sayesinde tanımlandı. İnsanda, DNA onarım genleri, genellikle DNA hasarını onarım açısından kusurlu kalıtımsal hastalıkları barındıran bireylerde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu hastalıklardan en çok çalışılanı, 250,000 kişiden birini etkileyen nadir bir genetik hastalık olan xeroderma pigmentosum (XP)'dur. Bu hastalığı taşıyan bireyler, UV ışığına aşırı duyarlıdırlar ve güneş gören vücut bölgelerinde yaygın deri kanserleri

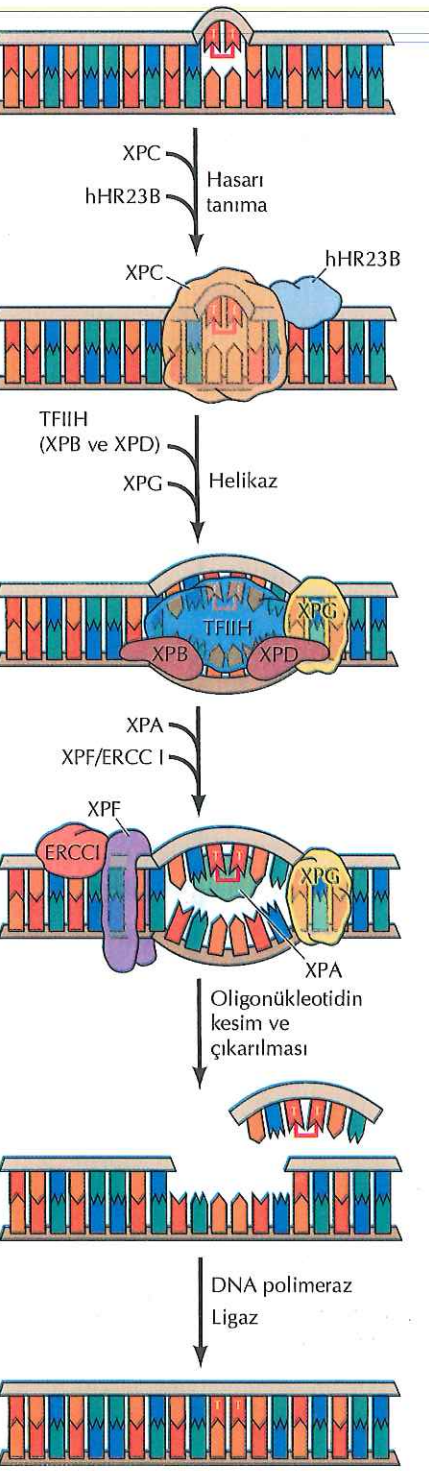


Şekil 5.23 Timin dimerlerinin nükleotid-çıkarma onarımı
Hasarlı DNA tanınır ve timin dimerinin her iki yanından, 3' ve 5' nükleazlar tarafından kesilir. Helikaz ile bölgenin açılması, hasarlı bazı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılmasıyla sonuçlanır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz tarafından bağlantı tamamlanır.

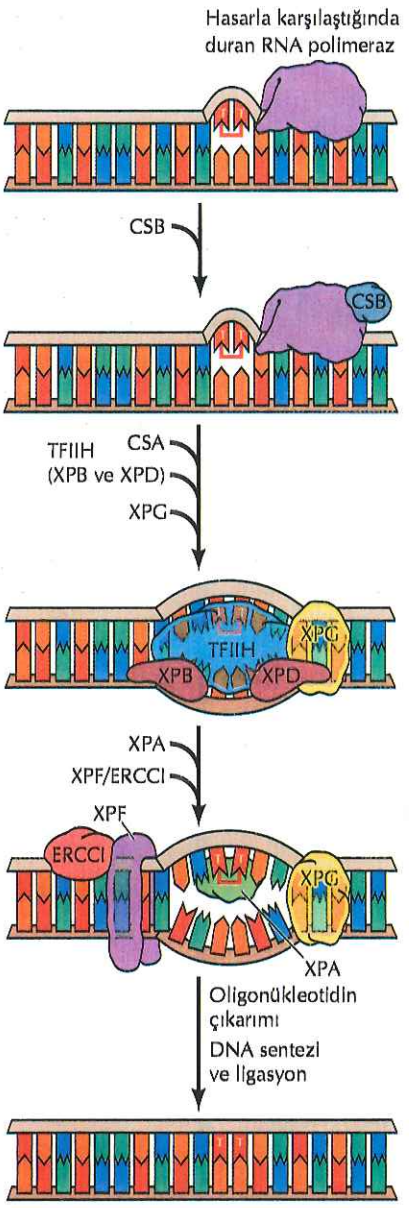
geliştirirler. James Cleaver 1968'de, XP hastaların kültürdeki hücrelerinin nükleotid-çıkarma onarım yeteneğinden yoksun olduklarını göstererek önemli bir buluş yaptı. Bu gözlem yalnızca DNA onarımı ile kanser arasındaki bağı gösteren ilk gözlem olmakla kalmamış, aynı zamanda insan DNA onarım genlerinin araştırılması için XP hücrelerini deneysel sistem olarak öne çıkarmıştır. İnsan DNA onarım genlerinin tanımlanması sadece XP hücreleriyle yapılan çalışmalarla değil, aynı zamanda, DNA onarım kusurundan kaynaklanan iki farklı insan hastalığı (Cockayne sendromu ve trichothiodystrophy) ve bir kemirgen hücre hattının UV-duyarlı mutantlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilmiştir. DNA onarımı bozuk memeli hücrelerinin varlığı, yabanıl tip onarım gen allellerinin, gen transferi testlerinde mutant hücreleri normal UV duyarlılık düzeyine getirebildiğinin gösterilmesi üzerine, onarım genlerinin izolasyonunu olası kılmış ve böylece, memelilerde nükleotid-çıkarma onarımının deneysel analizinde yeni kapılar açmıştır.

Moleküler klonlama; Cockayne sendromu, trichothiodystrophy ve UV-duyarlı kemirgen hücre mutantlarında mutasyona uğrayan genlerle birlikte, xeroderma pigmentosum'da mutasyona uğrayan yedi farklı onarım geni (XPA dan XPG'ye kadar simgelenmiştir) tanımlamıştır. Bu memeli DNA onarım genleri tarafından kodlanan proteinlerin, maya RAD genlerinden kodlanan proteinler ile yakın benzerlik göstermesi, nükleotid çıkarma onarımının ökaryotlarda korunmuş olduğuna işaret eder. Mevcut, klonlanmış maya ve memeli onarım genlerinin kodladıkları proteinlerin saflaştırılması ve onarım sistemindeki rollerini araştırmak üzere, *in vitro* sistemler geliştirilmesi mümkün olmuştur (Şekil 5.24). Memeli hücrelerinde kesip-çıkararak onarımın ilk basamağı, hatalı baz eşleşmesinin, XPC ile, maya Rad23 proteininin homologu olan ve hHR23B olarak adlandırılan bir proteinden oluşan kompleks tarafından tanınmasıdır. Bunu, XPB, XPD ve XPG proteinlerinin hasarlı bölgeye toplanması izler. XPB ve XPD proteinleri, ökaryotik genlerin transkripsiyonunun başlaması için gerekli, çok alt birimli bir transkripsiyon faktörünün (TFIIH olarak adlandırılır) bileşenidir (bkz. Bölüm 6) ve hasarlı bölgenin etrafındaki yaklaşık 30 baz çiftlik bölgenin açılması için helikaz etkisi gösterirler. Daha sonra XPA proteini hasarı onaylar ve XPF proteinini, ERCC1 (UV duyarlı kemirgen hücrelerinde tanımlanmış bir onarım proteini) ile heterodimer yapmış olarak, onarım kompleksine dahil eder. XPF/ERCC1 ve XPG, DNA'yı hasarlı bölgenin, sırasıyla 5' ve 3' yanlarından kesen endonükleazlardır. Bu kesim yaklaşık 30 bazlık bir oligonükleotidi çıkarır. Ortaya çıkan boşluk DNA polimeraz δ ve ε (RFC ve PCNA ile ilişkili olarak) doldurulur ve ligaz tarafından uçlar birleştirilir.

XPC/hHR23B kompleksi genom boyunca hasarlı DNA'yı tanırken, nükleotid-çıkarma onarımının **transkripsiyon-eşlikli onarım** olarak adlandırılan alternatif bir formu, özgül olarak, aktif transkribe edilen



Şekil 5.24 Memeli hücrelerinde nükleotid-kesip çıkarma onarımı
DNA hasarı (örn., bir timin dimeri) XPC/hHR23B kompleksi tarafından tanınır. XPB ve XPD helikazları barındıran transkripsiyon faktörü TFIIH ve XPG hasarlı bölgeye getirilir. XPB ve XPD ile DNA'nın açılmasının ardından hasar XPA ile doğrulanır ve XPF/ERCC1 kompleksi çağrılır. Daha sonra DNA, XPF/ERCC1 ve XPG endonükleazlar tarafından kesilir ve hasarlı oligonükleotid çıkarılır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz ile bağlantı tamamlanır.



Şekil 5.25 Memeli hücrelerinde transkripsiyon-eşlikli onarım
RNA polimeraz, transkribe olan DNA ipliğindeki hasarla karşılaştığında durur. Duran RNA polimeraz, transkripsiyon-onarım eşleşme proteinleri olan ve hasarlı DNA'ya TFIIH ve XPG'nin gelmesini sağlayan, CSA ve CSB tarafından tanınır. Onarım daha sonra, genel nükleotid-çıkarma onarım mekanizması ile gerçekleştirilir (bkz. Şekil 5.24)

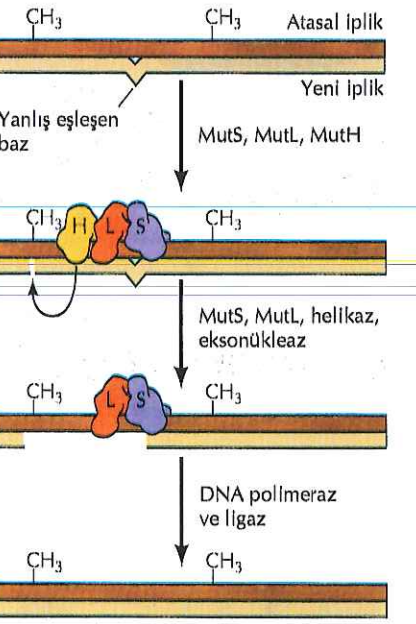
gen içerisindeki hasarların onarımını gerçekleştirir. Onarım ve transkripsiyon arasındaki bağlantı ilk kez, memeli hücrelerinde ve *E.coli*'de transkribe olan ipliklerin, olmayanlardan daha hızlı onarıldığını gösteren deneyler ile ortaya atılmıştır. DNA hasarı transkripsiyonu baskıladığından, bu transkripsiyon-onarım eşleşmesinin, aktif olarak eksprese olan genlerin hasarının öncelikli olarak onarılmasını sağladığı için, avantajlı olduğu düşünülmektedir. *E. coli*'de transkripsiyon-onarım eşleşme mekanizması, kopyalanan DNA ipliğinde bir lezyonda takılmış olan RNA polimerazın tanınmasını gerektirir. Duran RNA polimeraz, transkripsiyon onarım eşleşme faktörü adı verilen ve RNA polimerazı hasarlı bölgeden ayırıp UvrABC eksinükleazı göreve çağıran bir protein tarafından tanınır.

Memeli hücrelerinde, transkripsiyon-eşlikli onarım, duran RNA polimerazın CSA ve CSB proteinlerince tanınmasını gerektirir ki bu proteinler Cockayne sendromunda sorumlu genlerden kodlanmaktadır (Şekil 5.25). Xeroderma pigmentosumlu hastaların aksine, Cockayne sendromlu hastalar, CSA ve CSB'nin transkripsiyon-onarım eşlenme faktörleri olmalarıyla uyumlu şekilde, özgül olarak, transkripsiyon-eşlikli onarım yönünden kusurludurlar. CSA ve CSB; XPB, XPD ve XPG'nin hasarlı bölgeye çağırılmasında XPC/hHR23B kompleksi ile benzer hareket ederler. Bunu, XPA ve XPF/ERCC1 kompleksinin çağrılması ve hasarlı oligonükleotidin çıkartılması izler. Transkripsiyon-eşlikli onarım, DNA hasarının direk olarak XPC/hHR23B kompleksi tarafından tanınması yerine, duran RNA polimerazın CSA ve CSB tarafından tanıması dışında, genel olarak nükleotid çıkarma onarımı ile benzer şekilde işler.

Üçüncü bir onarım sistemi, DNA replikasyonu sürecinde yanlış eşleşmiş bazları tanır. Birçok yanlış eşleşmiş baz, DNA polimerazın, kendi yanlışını düzeltme aktivitesi ile uzaklaştırılır. Gözden kaçanlar daha sonra, yeni sentezlenmiş DNA'yı tarayan **yanlış eşleşme onarım** sistemi ile onarılır. Bir yanlış eşleşme bulunduğunda, bu sistemdeki enzimler, spesifik olarak, yeni replike olmuş DNA ipliğinde hatalı bazı bulup çıkarır ve hatanın düzeltilmesini ve orijinal dizinin korunmasını sağlarlar.

E.coli'de hatalı eşleşme onarım sisteminin, atasal DNA ipliği ile yeni sentezlenen DNA ipliğini birbirinden ayırt edebilme yetkinliği, bu bakterinin DNA'sının, GATC dizilerinde yer alan adeninlerin 6-metiladenin oluşturmak üzere metillenerek, değiştirilmesi esasına dayanır (Şekil 5.26). Metillenme replikasyondan sonra meydana geldiği için, yeni sentezlenen DNA iplikleri metillenmez ve böylelikle yanlış-eşleşme onarım enzimlerince spesifik olarak tanınabilir. Yanlış eşleşme onarımı, hatayı algılayan ve MutH ve MutL olarak adlandırılan diğer iki protein ile kompleks oluşturan MutS proteiniyle başlar. Daha sonra, MutH endonükleazı, metile olmamış DNA ipliğini GATC dizisinden keser. MutL ve MutS daha sonra bir eksonükleaz ve bir helikazla birlikte, iplikteki kırık ile yanlış eşleşme arasındaki DNA parçasını çıkarırlar, oluşan boşluk DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur.

Şekil 5.26 *E.coli*'de yanlış eşleşme onarımı
Yanlış eşleşme onarım sistemi, yeni replike olan DNA'yı henüz metillenmemiş olmasıyla atasal iplikten ayırt ederek yanlış eşlemiş bazı bulur ve uzaklaştırır. MutS yanlış eşleşmiş baza bağlandıktan sonra MutL de bağlanır. MutL'nin bağlanması MutH'yi aktive eder, o da bir metilasyon noktasının karşı tarafında, değiştirilmemiş ipliği keser. MutS ve MutL bir helikaz ve eksonükleaz ile birlikte, değiştirilmemiş ipliğin hasarı içeren kısmını keserek çıkarır. Oluşan boşluk daha sonra DNA polimeraz tarafından doldurulur ve ligaz tarafından bağlantı tamamlanır.

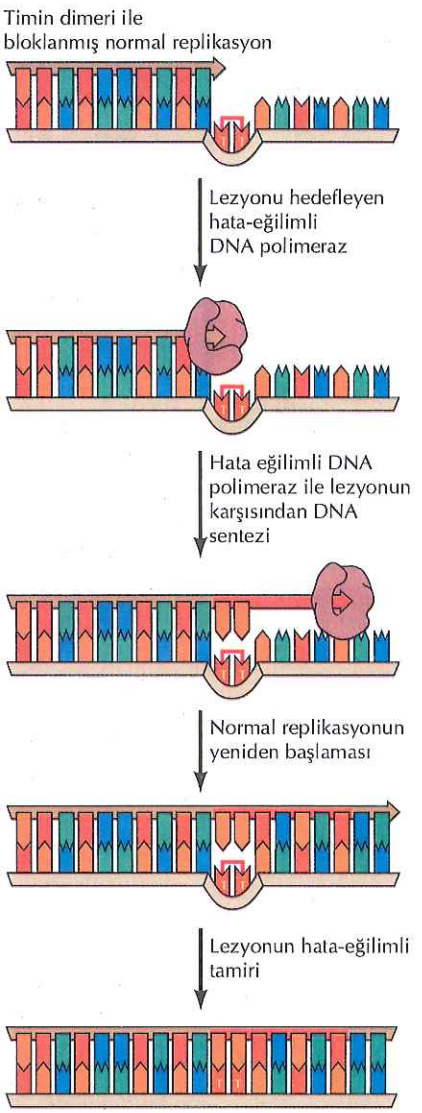


Ökaryotlar da, her ne kadar yeni replike olmuş DNA'yı tanımada kullandığı mekanizma *E.coli*'ninkinden farklı ise de, benzer yanlış eşleşme onarım sistemine sahiptirler. Memeli hücrelerinde yanlış eşleşme onarımı iplik özgüllüğünün, DNA metilasyonu ile tanımlanmadığı görülmektedir. Onun yerine, tek iplik kırıklarının varlığı (yeni replike olan DNA'da bulunur) veya MutS ve MutL'nin ökaryotik homologlarının replikasyon sistemi ile birleşmesi, onarılacak ipliği belirliyor olabilir. *MutS* ve *MutL* homologları daha sonra yanlış eşleşmiş baza bağlanırlar ve *E.coli*'de olduğu gibi, yanlış eşleşme ile bir iplik kırığı arasındaki DNA'yı çıkarırlar. MutS ve MutL'nin insandaki eşdeğerlerinde mutasyonların, yaygın bir kalıtsal kolon kanseri tipinin (kalıtımsal polipsiz kolorektal kanser veya HNPCC) oluşumundan sorumlu olması gerçeği, bu onarım sisteminin önemine dramatik bir örnektir. HNPCC en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir; her 200 kişiden birini etkilemektedir ve bu ülkedeki (ABD) bütün kolorektal kanserlerin %15'inin nedenidir. Yanlış eşleşme onarım mekanizmasındaki aksaklık ile HNPCC arasındaki ilişki 1993'de, iki araştırma grubunun, *MutS*'nin insan eşdeğerini klonlanmaları ve bu gendeki mutasyonların, bütün HNPCC vakalarının yarısından sorumlu olduğunu bulmaları sonucu keşfedilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, geri kalan HNPCC olgularının çoğunun *MutL*'nin eşdeğeri olan üç insan geninden birindeki mutasyonlardan kaynaklandığını göstermiştir. Bu genlerdeki bozukluğun, hücrenin diğer genlerinde mutasyon sıklığını artırdığı ve bu mutasyonlardan bazılarının en nihayetinde kansere neden olma olasılığının da, bununla uyumlu olarak artacağı görülmektedir.

Hata-Eğilimli Onarım

Direk uzaklaştırma ve kesip çıkararak onarım sistemleri DNA hasarını replikasyondan önce onarırlar, böylelikle replikatif DNA sentezi, kalıp olarak hasarsız DNA ipliğini kullanarak gerçekleşebilir. Bu sistemler başarısız olursa, hücrenin, replikasyon çatalında hasarlı DNA'yı onarabileceği alternatif mekanizmalar bulunmaktadır. Pirimidin dimerleri ve birçok diğer tip lezyon, DNA polimerazın normal işleviyle kopyalanamaz, böylece replikasyon bu hasarlı bölgeye geldiğinde durur. Bununla beraber, hücreler DNA hasarlı bölge üzerinden replikasyonu devam ettirebilen, bir kaç sıra dışı, özelleşmiş DNA polimeraza da sahiptir. Hasarlı DNA'nın bu özelleşmiş DNA polimerazlar ile replikasyonu, doğru olmayan bazların eklenmesi olasılığını artırabilir, bu nedenle, DNA hasarının bu şekilde üstesinden gelmeye, **hata-eğilimli onarım** adı verilir.

İlk hata-eğilimli DNA polimeraz 1999 yılında *E.coli*'de bulunmuştur. Bu enzim DNA polimeraz V olarak adlandırılmaktadır ve aşırı UV radyasyonuna yanıt olarak indüklenmekte ve timin dimerleri üzerinden yeni DNA ipliğinin sentezini gerçekleştirebilmektedir (Şekil 5.27). Diğer iki *E.coli* DNA polimerazı, Polimeraz II ve IV de benzer şekilde DNA hasarı ile indüklenirler ve hata eğilimli onarımda görev alırlar. Ökaryot hücreler de, çok sayıda hata-eğilimli



Şekil 5.27 Hata eğilimli onarım
Normal replikasyon bir timin dimeri ile durur, fakat DNA polimeraz V (pol V) gibi hata eğilimli DNA polimerazlar hasarlı bölgeyi tanırlar ve hasar üzerinden replikasyonu sürdürürler. Replikasyon normal replikatif DNA polimerazlarca devam ettirilir ve timin dimeri daha sonra nükleotid çıkarma onarımıyla uzaklaştırılır. Hata eğilimli polimerazlarla sentezlenen DNA yüksek oranda yanlış baz barındırır.

onarım DNA polimerazları içerirler, bugüne değin insanda dokuz tane böyle enzim saptanmıştır. Bütün bu hata eğilimli DNA polimerazlar, hasarlı olmayan DNA'yı kopyaladıklarında düşük doğrulukta çalışma göstermektedirler. Normal replikatif DNA polimerazlara (örn., *E.coli*'de polimeraz III ve ökaryotlarda δ ve ε) kıyasla, hata oranları 100 ile 10,000 kez daha yüksektir. Ek olarak, hata eğilimli polimerazlar normal replikatif DNA polimerazlar için karakteristik olan 3'den 5' yanlışını düzeltme aktivitesine sahip değildir (bkz. Şekil 5.12).

Bununla birlikte, hata eğilimli polimerazların hasarlı DNA'daki spesifik lezyonların karşısına doğru bazları yerleştirmek üzere özelleşmiş olmaları ve böylelikle hasarlı DNA'yı kalıp olarak kullanarak doğru bir yeni iplik sentezleyebilmeleri önemlidir. Örneğin, *E.coli* polimeraz V, spesifik olarak timin dimerlerini tanır ve doğru bir biçimde karşı ipliğe AA'yı ekler. Diğer taraftan polimeraz V, başka tipte hasarları olan bir ipliğin karşısına yeni bir DNA ipliğini sentezlediğinde yüksek oranda hata yapar. Bu enzimler, hasarlanmamış normal kalıptan DNA sentezinde veya DNA hasarının farklı formlarını karşısına hata eğilimli olmalarına karşın, DNA hasarının bazı tiplerinde de karşı ipliğe doğru bazları spesifik olarak ekleyebilirler.

Rekombinasyonel Onarım

DNA onarımının bir başka biçimi olan **rekombinasyonel onarım**, hasarlı DNA'nın hasarsız bir moleküle rekombinasyonu temeline dayanır. Bu mekanizma DNA replikasyonu sırasında karşılaşılan ve normal replikatif DNA polimerazlarca kopyalanamayarak bir replikasyon çatalının ilerlemesini bloke eden, timin dimerlerinin veya diğer lezyonların bulunduğu hasarların onarımında sıklıkla kullanılır. Rekombinasyonel onarım, bir atasal DNA ipliğinin hasarsız olduğu ve replikasyon sürecinde hasarlı ipliğin onarımında kullanılacak olan normal bir yeni molekülün kopyalanmasını sağladığı durumda geçerlidir.

Rekombinasyonel onarımın moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır ve farklı hücre tiplerinde faklılık gösterebilir, ancak, Şekil 5.28'de simgesel bir model sunulmuştur. Bu örnekte normal replikasyon, DNA'nın bir ipliğindeki bir timin dimerinin varlığı ile durdurulmuştur. Bununla beraber, hasarlı bölgenin ilerisinde replikasyon bir Okazaki fragmanının sentezi ile yeniden başlatılabilir ve hasarlı kalıp iplik üzerinden devam edebilir. Sonuç, atasal iplikteki hasarın karşısına gelecek şekilde bir boşluğu olan bir yavru ipliktir. Normal bir yavru molekül vermek üzere kopyalanan hasarsız kalıp iplik, homolog DNA dizileri arasında bir rekombinasyon ile hasarlı bölgenin karşısındaki boşluğu doldurmakta kullanılabilir (bir sonraki bölüme bakınız). Daha önceden sağlam olan kalıp iplikte, rekombinasyon sonucu oluşan boşluk, karşısında hasarsız iplik bulunduğu için DNA polimeraz tarafından doldurulabilir. Her ne kadar diğer atasal molekül hala orijinal hasarı barındırıyorsa da, hasar normal bir ipliğin karşısında yerleşiktir ve daha sonra, kesip-çıkararak onarım ile düzeltilebilir.

Rekombinasyonel onarım aynı zamanda iyonize radyasyon (X ışınları gibi) veya bazı kimyasallar ile oluşturulan çift iplik kırıklarının onarımı için de belli başlı mekanizmadır (Şekil 5.29). Bu tip bir hasar her iki ipliği de etkilediği için, onarımı özellikle zordur. Hasarsız kromozom üzerindeki homolog DNA dizileri ile rekombinasyon bu tip hasarların onarımına ve normal DNA dizisinin yerine konmasına olanak sağlar. Alternatif olarak çift iplik kırıklar basitçe tek DNA

MOLEKÜLER TIP

Kolon Kanseri ve DNA Onarımı

Hastalık

Kolon ve rektum kanserleri (kolorektal kanserler) batı ülkelerindeki en yaygın kanser tiplerindendir ve birleşik devletlerde, her yıl, yaklaşık 140,000 vaka rapor edilmektedir (toplam kanser olgularının yaklaşık %10'u). Kolon kanserlerinin çoğu (diğer kanser tipleri gibi) kalıtılan hastalık değildir, yani ebeveynlerden çocuklarına direkt olarak aktarılmaz. Bununla birlikte, kolon kanserinin iki kalıtsal formu tanımlanmıştır. Her iki sendromda da, kansere yatkınlık geninin kalıtılması kanser gelişme olasılığını artırmaktadır. Kolon kanserinin kalıtımsal formlarından biri (ailesel adenomatoz polipozis) oldukça nadirdir, toplam kolon kanseri olgularının %1'inden daha azdır. Kolon kanserinin ikinci kalıtımsal formu (kalıtsal polipsiz kolorektal kanser veya HNPCC) daha yaygındır ve bütün kolon kanser olgularının %15'ini oluşturmaktadır. Aslında HNPCC, 200 kişiden birini etkiler ve en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir. Her ne kadar kolon kanserleri bu hastalığın en genel belirtisi ise de, etkilenmiş bireyler endometriyum ve over kanserlerinin de dahil olduğu birçok kanser tipine yakalanma riski taşırlar.

Moleküler ve Hücresel Temel

Diğer kanserler gibi, kolorektal kanserler de hücre çoğalmasını düzenleyen genlerde ortaya çıkan ve kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına yol açan mutasyonların sonucudur. Birçok vakada bu mutasyonlar, somatik hücrelerde sporadik olarak görülür. Ancak, kalıtımsal kanserlerde, kalıtılan germ-hattı mutasyonlar bireyi kanser gelişimine yatkın hale getirmektedir.

1993 yılında HNPCC vakalarının yaklaşık %50'sinden sorumlu olan ve DNA'nın yanlış eşleşme onarımında rol alan bir enzimi kodlayan genin saptanması ile önemli bir gelişme kaydedildi; bu gen *E.coli MutS* geninin insan homologuydu. Daha sonraki çalışmalar, geri kalan HNPCC vakalarından sorumlu olan diğer üç gen de, *MutL* homologlarıdır ve dolayısıyla, yanlış eşleşme onarım yolağında görevlidirler. Bu genlerdeki bozukluklar diğer hücresel genlerde artmış mutasyon sıklığına neden olmakta ve bu mutasyonlardan bazılarının hücre üremesini denetleyen genleri etkileyerek, kansere yol açması kaçınılmaz görülmektedir.

Önlem ve Tedavi

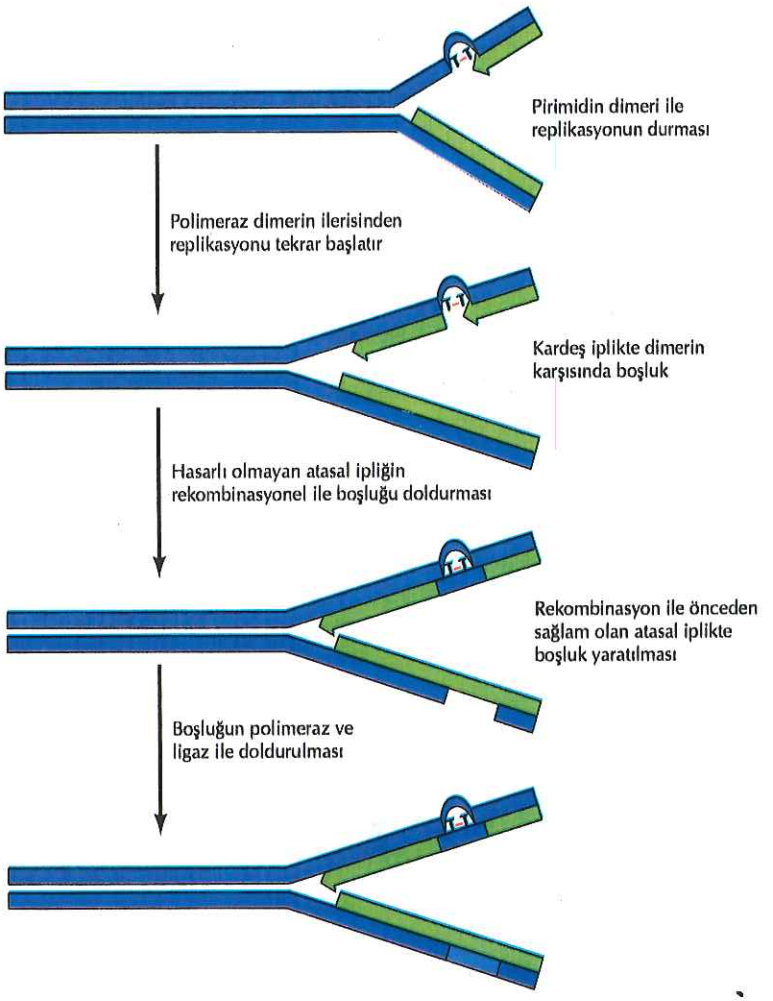
Diğer kalıtsal hastalıklarda olduğu gibi, HNPCC'den sorumlu genlerin tanımlanması, genetik testlerle bu kalıtımsal kanser riskini taşıyan bireylerin saptanmasına olanak sağlar. Hatta, doğum öncesi genetik tanı, bir aile kurmak isteyen HNPCC mutasyonu taşıyıcıları için çok önemli olabilir. Bununla beraber, bu mutasyonların saptanmasının potansiyel getirileri yalnızca, mutant genlerin bir sonraki nesle aktarılmasının engellenmesi ile sınırlı değildir, aynı zamanda etkilenmiş bireylerde kanser gelişiminin önlenmesine de yardımcı olabilir.

Hastalıktan korunma açısından, kolon kanserinin önemli özelliği yıllar boyunca kademeli gelişim göstermesidir. Hastalığın erken tanısı, hastanın hayatta kalma şansını önemli ölçüde artırmaktadır. Kolon kanser gelişiminin başlangıç aşaması, küçük, selim poliplerin büyümesidir ki bunlar, daha sonra kötücül karakter kazanarak çevre bağ dokusuna sızarlar. Malinite karakter gelişiminden önce, polipler operasyonla kolaylıkla uzaklaştırılarak kötü huylu tümör gelişimi etkin biçimde engellenebilir. Kolon kanserinin erken aşamaları ve polipler, kolonun ışıklandırılmış ince bir tüple incelenmesi (kolonoskopi) ile saptanabilir, böylelikle HNPCC hastalarında sık kolonoskopi yapılarak kanser gelişiminden önce polipler uzaklaştırılabilir. Ayrıca, HNPCC hastaları için önemli getirileri olabilecek birkaç ilacın, kolon kanser gelişiminin baskılayıcıları olarak, testleri devam etmektedir. HNPCC'den sorumlu mutasyonların saptanması, benzer koruyucu önlemlerin zamanında alınabilmesine olanak vererek hastalığın önlenmesinde önemli katkı sağlamaktadır.

Kolonoskopi ile görüntülenen bir kolon polipi. (David M. Martin, M.D. / SPL / Photo Researchers, Inc.)

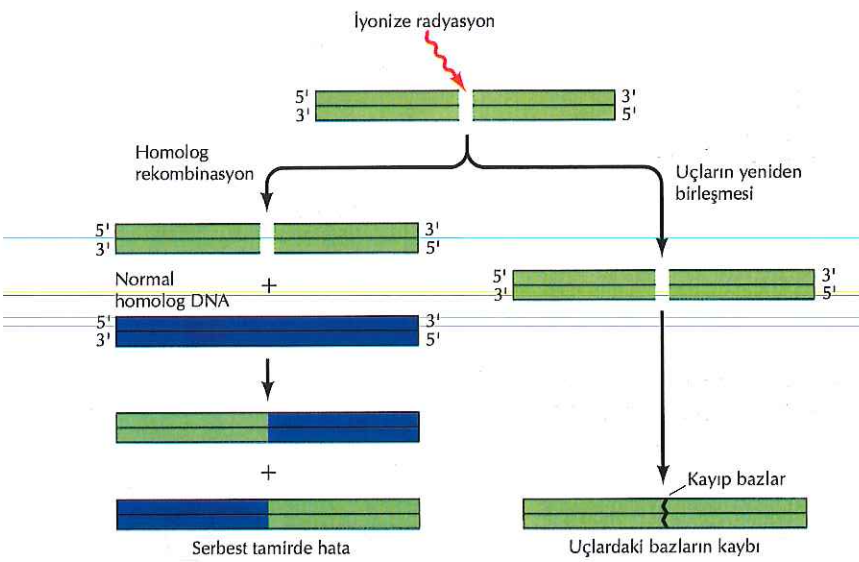
molekülündeki kırık uçların yeniden birleştirilmesiyle onarılabilir, ancak hasar bölgesinin etrafındaki bazların kaybından dolayı hata sıklığı yüksektir. Kalıtsal meme kanserinden sorumlu olan genlerin (BRCA1 ve BRCA2) kodladığı proteinlerin homolog rekombinasyon ile çift iplik kırıkların onarımında görevli olmaları, bu DNA onarımındaki bozukluğun, kadınlarda en yaygın kanserlerden birisinin gelişimine yol açabileceğini gösterir.

Şekil 5.28 Rekombinasyonel onarım Bir timin dimerinin varlığı replikasyonu durdurur, ancak DNA polimeraz lezyonu atlayarak dimerin ilerisinden replikasyonu tekrar başlatabilir. Bunun sonucu, yeni sentezlenen iplikte dimerin karşısında gelen kısımda bir boşluktur. Bu boşluk, hasarlı olmayan atasal iplik ile rekombinasyon yoluyla doldurulur. Her ne kadar bu, önceden sağlam olan atasal iplikte bir boşluk yaratırsa da, sağlam yavru ipliğin kalıp olarak kullanılmasıyla DNA polimeraz ve ligaz tarafından doldurulur. Böylelikle iki tam DNA molekülü oluşur, geriye kalan timin dimeri, kesip-çıkararak onarım ile uzaklaştırılabilir.



Homolog DNA Dizileri Arasında Rekombinasyon

DNA hasarının onarımı ve DNA replikasyonunun doğruluğu genetik bilginin korunması ve atadan döle, doğru aktarımının sağlanması için esastır. Daha önceki kısımda tartışıldığı gibi, rekombinasyon DNA hasarının onarımında önemli bir mekanizmadır. Rekombinasyon ayrıca, evrim açısından önemli olan genetik çeşitliliğin oluşumunda önemli rol oynar. Bireyler arasındaki genetik farklılıklar, türlerin değişen koşullara adapte olarak evrimleşmelerine olanak sağlayan doğal seçilimin temel başlangıç materyalini oluşturur. Rekombinasyon, bu süreçte genlerin değişik kombinasyonlarda bir araya gelmesine olanak vererek önemli bir rol oynar. Örneğin, mayoz sırasında rekombinasyon, eşleşen homolog kromozomlar arasında genlerin değişimini sağlar. Ayrıca, rekombinasyon, gelişim ve değişim sürecinde bazı spesifik DNA dizilerinin, genlerin ekspresyon ve fonksiyonunu değiştiren yeniden düzenlenmeleri için de gereklidir. Böylelikle rekombinasyon, türler arasındaki genetik çeşitliliğe katkıda bulunmasının yanı sıra organizmaların ve hücrelerin yaşamında önemli rol oynamaktadır.



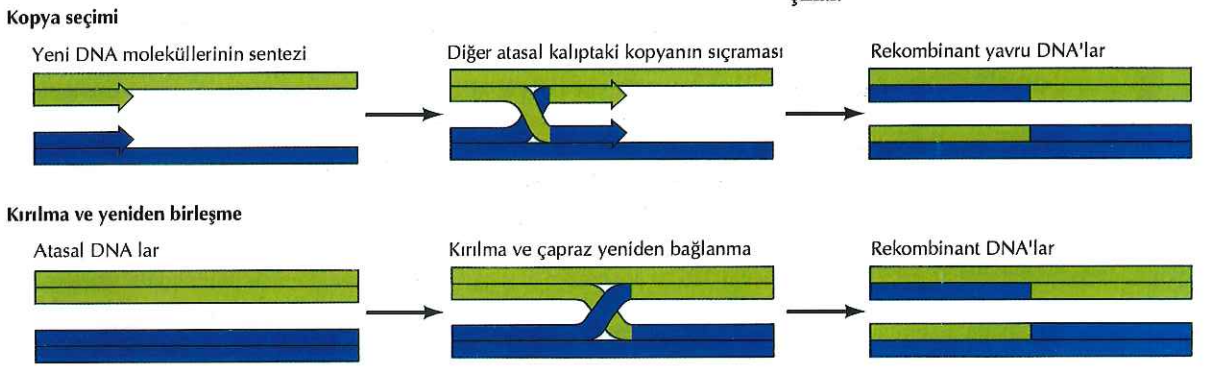
Şekil 5.29 Çift iplik kırıkların onarımı
İyonize radyasyon ve bazı kimyasallar DNA'da çift iplik kırıkları oluşturur. Bu kırıklar, normal kromozomla homolog rekombinasyon yoluyla onarılır ve böylece, orijinal DNA dizisi yenilenir. Alternatif olarak kırık molekülün uçları, hasarlı kısımda bulunan bazların kaybıyla sonuçlanacak şekilde yeniden birleştirilir.

Bu bölüm, yüksek dizi homolojisine sahip DNA molekülleri arasındaki rekombinasyonun moleküler mekanizmasını tartışıyor. Örnekler, eşleşen bakterilerin kromozomları arasındaki rekombinasyonu, mayoz sürecinde eşleşmiş ökaryot kromozomları arasında rekombinasyonu ve DNA onarım sürecindeki homolog rekombinasyonu içermektedir. Rekombinasyonun bu tipi, iki homolog DNA molekülü arasında olması nedeniyle, kromozomdaki genlerin düzenini değiştirmez. Ancak, diğer rekombinasyon tipleri yüksek dizi benzerliği gerektirmez ve bu nedenle, ilişkisiz DNA'lar arasında meydana gelebilir. Bu tip rekombinasyon olayları, bu bölümde daha ilerde tartışacağımız, gen yeniden düzenlenmelerine yol açar.

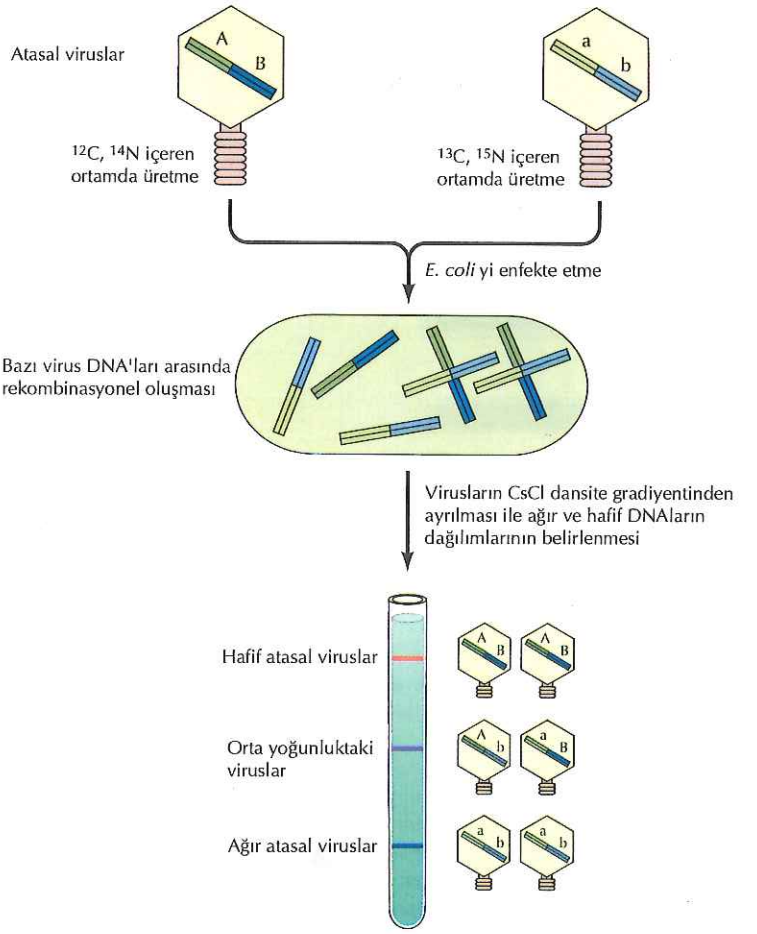
DNA Molekülleri Kırılma ve Yeniden Birleşme Yoluyla Bir Araya Gelir

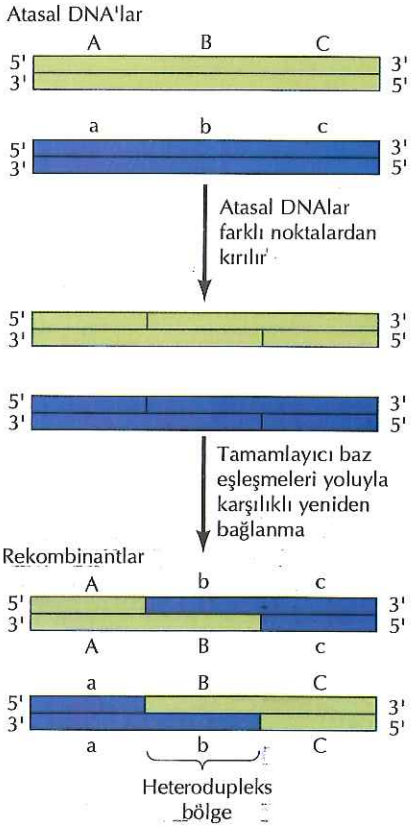
Genetik rekombinasyon, *Drosophila* çalışmalarında homolog kromozomların farklı kopyalarındaki genlerin mayoz sırasında yeniden ayrışabildiğinin gözlenmesi üzerine, ilk kez tanımlanmıştır. Genlerin DNA yapısında olduğunun keşfiyle, rekombinasyonun moleküler düzeyde açıklanması için iki alternatif model ileri sürüldü (Şekil 5.30). "Kopya seçimi" modeli, rekombinant molekülün, DNA

Şekil 5.30 Rekombinasyon modelleri
Kopya seçiminde, rekombinasyon yeni DNA moleküllerinin sentezi sırasında oluşur. DNA replikasyonu bir atasal DNA kalıbından başlar ve ikinci atasal moleküle atlar, sonuçta her iki ebeveyne ait diziler içeren rekombinant yavru DNA'lar oluşur. Kırılma ve yeniden birleşmede rekombinasyon, atasal DNA moleküllerinin kırılma ve çapraz yeniden birleşmelerinin bir sonucu olarak ortaya çıkar.



Şekil 5.31 Kırılma ve yeniden birleşme ile rekombinasyonun deneysel gösterimi
Genetik olarak farklı atasal viruslar DNA'larının yoğunluk-işaretlenmesi için karbon (^{12}C veya ^{13}C) ve azotun (^{14}N veya ^{15}N) hafif ve ağır izotoplarını içeren ortamlarda üretildi. *E.coli*, replikasyonun baskılandığı koşullarda enfekte edildi ve oluşan viruslar toplanıp, genetik rekombinantların yoğunluklarının belirlenmesi için, CsCl gradiyenti içerisinde denge santirfüjlemesi ile incelendi. Rekombinant virusların, kırılma ve yeniden birleşme ile her iki ebeveynden DNA edindiklerini gösterecek şekilde, ara yoğunlukta oldukları saptandı.

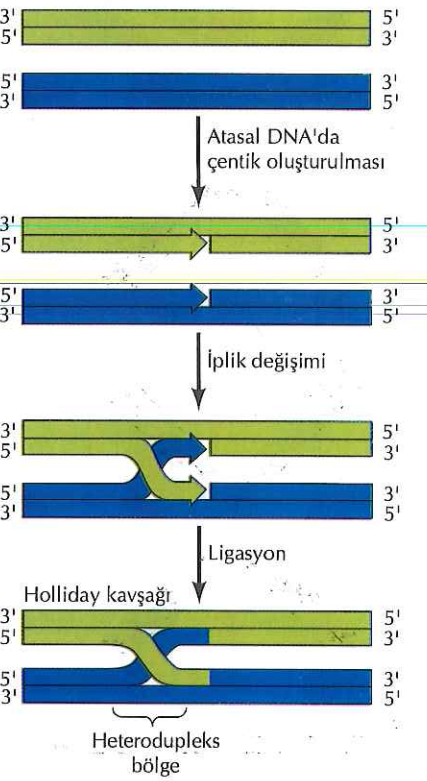




sentezi sırasında önce bir atasal DNA'nın kopyalanması ile başlayıp, daha sonra kopyalamanın farklı bir kalıpla devam etmesi sonucunda oluştuğunu ileri sürmekteydi. Alternatif öneri ise rekombinasyonun, yeni bir DNA senteziyle değil, iki atasal DNA molekülünün kırılıp yeniden birleşmesinden kaynaklandığıydı.

Bu alternatifler ilk kez 1961 de, bakteri viruslarının genomları arasındaki rekombinasyon çalışmalarıyla belirlendi (Şekil 5.31). *E.coli*'nin, değişik genetik belirteçler taşıyan viruslar ile enfeksiyonunun rekombinant viruslar ürettiği biliniyordu. Bu rekombinasyonun atasal DNA'ların kırılıp yeniden birleştirilmesiyle mi oluştuğunu saptamak için, atasal viruslardan biri karbonun (^{13}C) ve azotun (^{15}N) ağır izotoplarının bulunduğu ortamlarda üretilirken diğeri normal hafif izotop (^{12}C ve ^{14}N) içeren ortamda üretildi. Sonuçta, CsCl gradientinde denge yoğunluk santirfügasyonu ile ayrımlanabilen, değişik yoğunluklara sahip atasal viruslar elde edildi. *E.coli* daha sonra replikasyonun baskılandığı koşullarda, farklı şekilde işaretlenmiş bu

Şekil 5.32 Tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla homolog rekombinasyon
Atasal DNA'lar farklı noktalardan kırılır ve üst üste gelen tek-iplikli bölgeler, homolog dizilerin baz eşleşmesi sonucu yer değiştirir. Sonuç, iki DNA ipliğinin farklı atasal moleküllerden türediği, bir heterodupleks bölgedir.



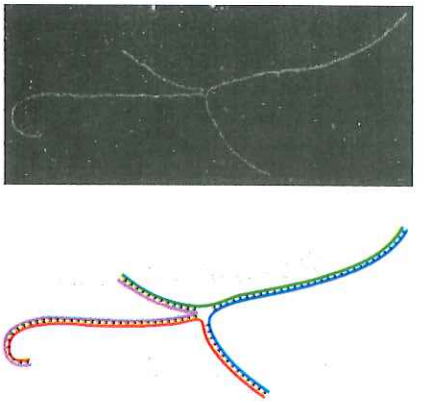
Şekil 5.33 Homolog rekombinasyon için Holliday modeli
Her iki atasal iplikte aynı pozisyonda tek iplik çentikler oluşturulur. Daha sonra, kesilen iplikler tamamlayıcı baz eşleşmesi ile, karşılıklı değişirler ve bağlanma ile, Holliday kavşağı olarak adlandırılan çaprazlanmış-iplik ara ürünü oluşur.

atasal viruslarla enfekte edildi ve yeni oluşan viruslar hem genetik özellikleri hem de yoğunlukları açısından incelendi. Ara yoğunlukta genetik rekombinant virusların elde edilmesi, kopya seçimi modelinin değil kırılma ve yeniden birleşme modelinin önerdiği şekilde, her iki atadan da DNA edinildiğini göstermekteydi.

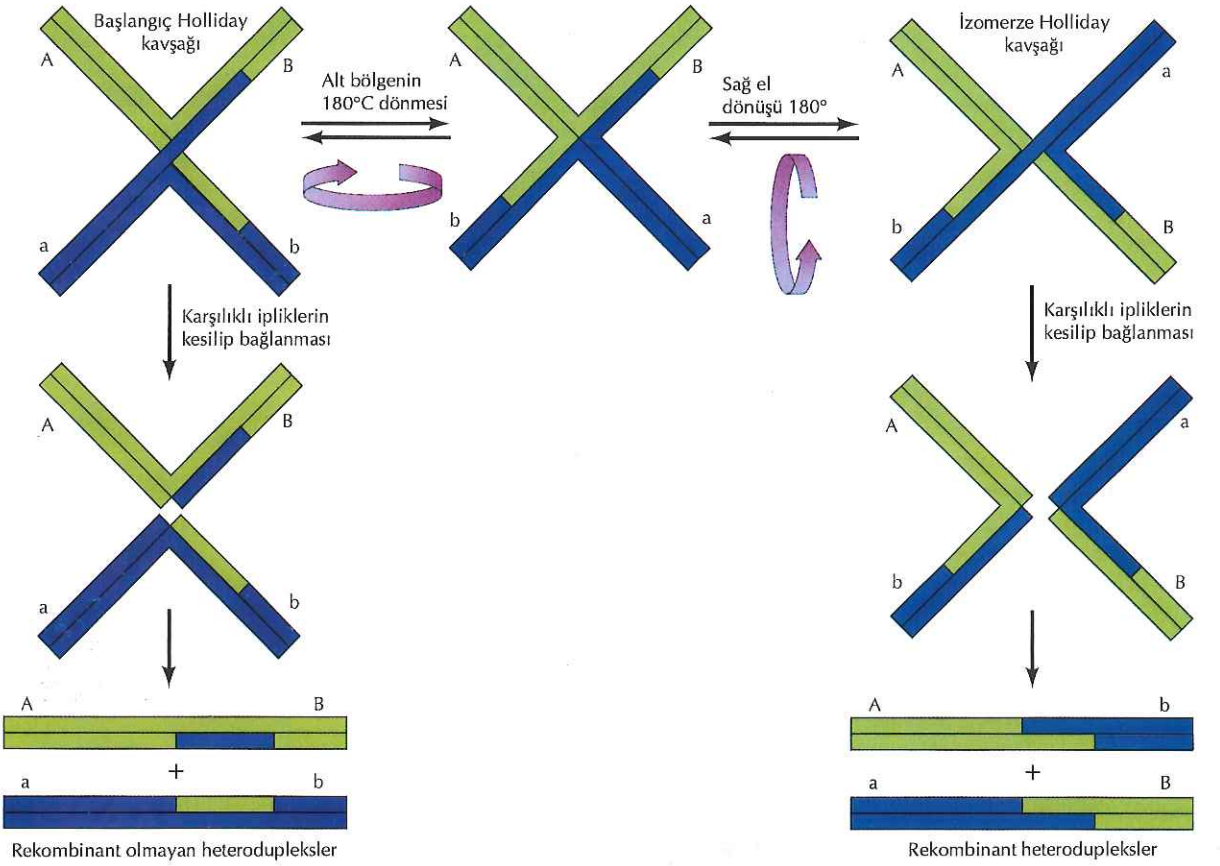
Homolog Rekombinasyon Modelleri

Rekombinasyonun kırılma ve yeniden birleşme ile oluştuğunun bulunması önemli bir soruyu gündeme getirdi: İki atasal DNA molekülü, kırılma noktasında nükleotidlerin kaybı veya kazancından kaynaklanan mutasyonlar olmadan, tam aynı noktadan nasıl kırılabilir? Homolog DNA molekülleri arasındaki rekombinasyon sırasında **(genel homolog rekombinasyon)** bu hizalama, beklendiği gibi, tamamlayıcı DNA iplikleri arasındaki baz eşleşmesiyle sağlanmaktadır (Şekil 5.32). Üst üste binen tek iplikler homolog DNA molekülleri arasında değişir ve rekombinant çift sarmalın iki ipliğinin farklı ebeveynden geldiği bir heteroduplekş bölge oluşur. Eğer heteroduplekş bölge bir genetik faklılık barındırıyorsa, sonuç iki genetik belirteç barındıran tek yavru DNA molekülüdür. Bazı durumlarda bir heteroduplekşdeki yanlış eşleşmiş bazlar yanlış eşleşme onarım sistemi tarafından tanınır ve bu bölümde önceden tartışıldığı gibi onarılır. Mayalarda ve bakterilerde rekombinasyon çalışmaları ile elde edilen, heteroduplekşlerin oluşumu ve onarımına ilişkin kanıtlar, 1964 yılında rekombinasyon için bir moleküler model geliştirilmesini sağladı. **Holliday modeli** (Robin Holliday'e ithafen) olarak bilinen bu model, her ne kadar yeni veriler ile değişmiş ise de, rekombinasyon mekanizmaları hakkında bugünkü düşünce için temel oluşturmayı sürdürmüştür.

Holliday modelinin orijinal versiyonu, rekombinasyonun iki atasal DNA molekülünde aynı pozisyonda çentik oluşturulması ile başladığını ileri sürmektedir (Şekil 5.33). Kesik DNA iplikleri kısmen çözülür ve kesilmemiş tamamlayıcı iplikle eşleşerek diğer moleküle geçer. Daha sonra, kırık ipliklerin bağlanmasıyla, **Holliday kavşağı** denilen çaprazlanmış-iplik şeklinde bir ara ürün oluşur, bu yapı rekombinasyonun temel ara ürünüdür. Holliday kavşağının elektron mikroskopisi ile gösterilmesi rekombinasyonun bu modeli için net bir destek sağlamıştır (Şekil 5.34).



Şekil 5.34 Elektron mikroskopi ile Holliday kavşağının tanımlanması
E.coli plazmid DNA'larının rekombinasyonu sürecinde belirlenen bir Holliday kavşağının elektron mikroskop fotoğrafı. Yapının açıklayıcı çizimi aşağıda gösterilmiştir. Molekül, çaprazlanmış-iplik ara ürününün dönmesi sonucu, açık biçimiyle bir Holliday kavşağını göstermektedir (bkz. Şekil 5.33). (Güney Florida Üniversitesi'nden Huntington Potter'in ve Oxford Üniversitesi'nden David Dressler'in nazik katkılarıyla.)



Şekil 5.35 Holliday kavşaklarının izomerleşmesi ve çözünmesi
Holliday kavşakları, çaprazlanmış ipliklerin kesilme ve yeniden birleşmeleri ile çözülür. Eğer başlangıç iplik değişimi ile oluşmuş bir Holliday kavşağı çözülürse, oluşan yavrular heteroduplekstir, fakat heterodupleks bölge dışındaki genetik belirteçler açısından rekombinant değildir. Bununla beraber, çaprazlanmış-iplik molekülün iki dönüşü, başlangıçta kesilen ipliklerin değil kesilmemiş atasal ipliklerin çaprazlandığı bir izomer oluşturur. Bu izomerin çaprazlanmış ipliklerinin kesilip yeniden birleşmesiyle, rekombinant heterodupleks yavrular oluşur.

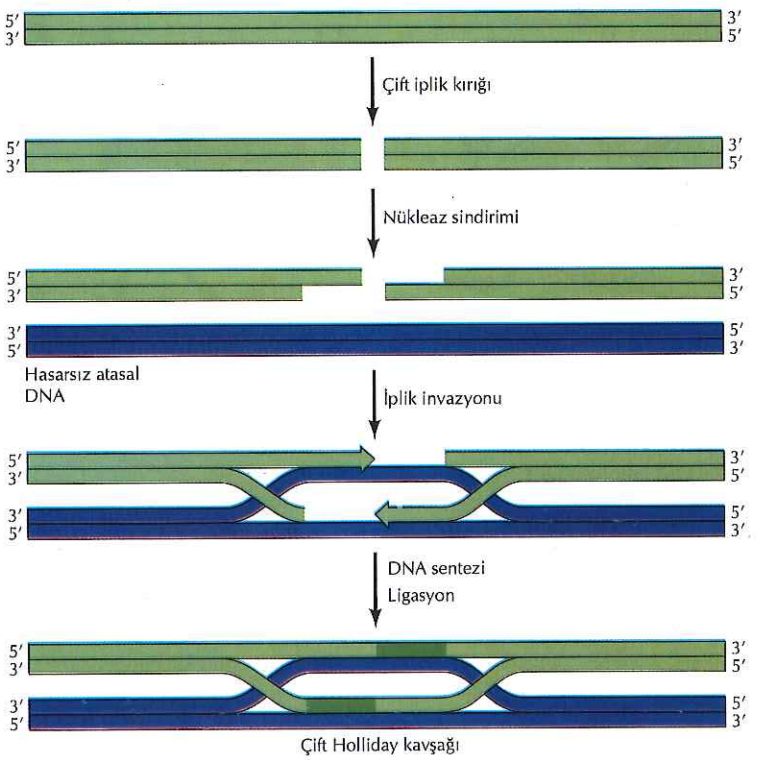
Bir Holliday kavşağı oluştuktan sonra, çaprazlanmış ipliklerin kesilip yeniden birleştirilmesi yoluyla, rekombinant molekülü oluşturmak üzere çözülür (Şekil 5.35). Bu, Holliday kavşağının yönlenimine bağlı olarak, iki farklı izomer oluşturmak üzere iki değişik yolla gerçekleşir. Başlangıçtaki iplik değişiminden kaynaklanan izomerde, çaprazlanmış iplikler rekombinasyon sürecinin başlangıcında kesilmiş olanlardır. Ancak, bu yapının basit bir dönüşü, kesilmemiş atasal ipliklerin çaprazlandığı farklı bir izomer ürün verir. Farklı izomerler halinde çözünme farklı genetik sonuçlar doğurur. Birinci durumda, yavru moleküller heterodupleks bölgelere sahiptir, ancak bu bölgenin iki yanındaki DNA rekombinant değildir. İzomerleşme olursa, çaprazlanmış ipliklerin kesilme ve yeniden birleşmesi, heterodupleks bölgelerin iki yanında rekombinant DNA içeren yavru moleküller verir. Holliday kavşağının yapısı böylelikle,

Holliday modelinin oluşturulmasına temel olan genetik bilgi ile uyumlu şekilde, rekombinant ve non-rekombinant heterodupleksl erin ikisinin de oluşmasına olanak sağlamaktadır.

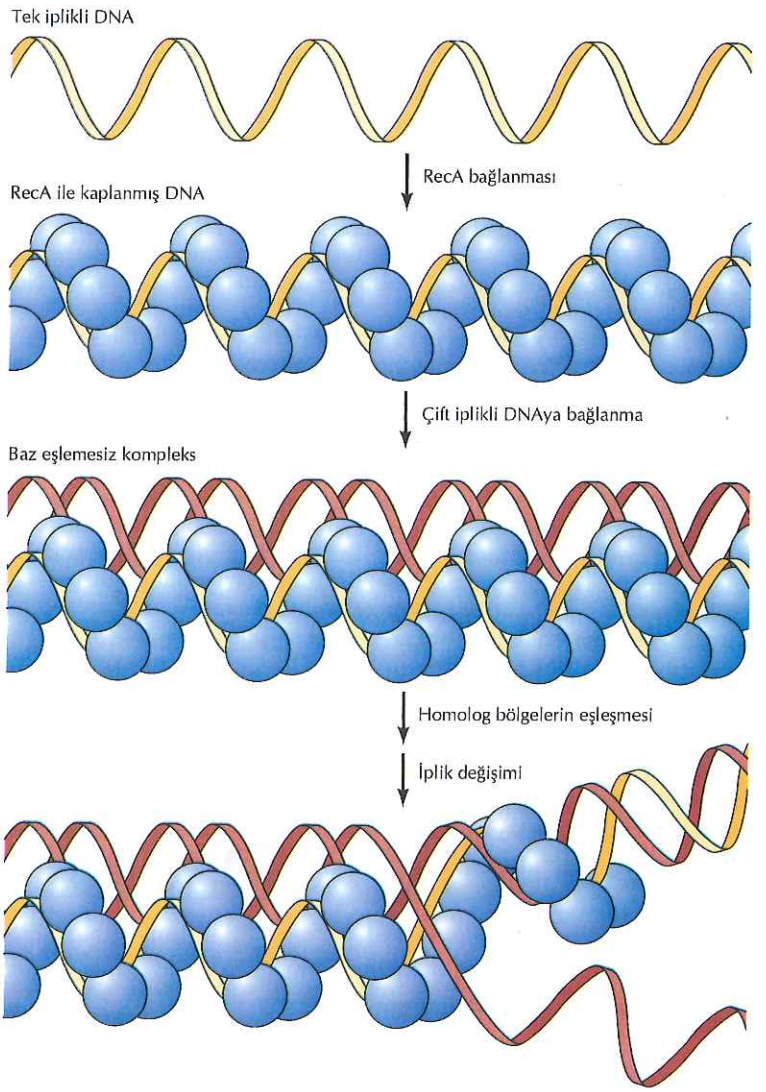
Başlangıçta ileri sürüldüğü gibi, Holliday modeli, her iki atasal molekülde aynı anda aynı pozisyonda kesilme ile rekombinasyonun nasıl başladığını açıklayamamaktadır. Bugün, mayoz sürecinde homolog kromozomlar arasındaki ve DNA onarımı sırasında gerçekleşen rekombinasyonun, genellikle, çift iplik kesilmesiyle başladığı anlaşılmaktadır (Şekil 5.36). Çift iplik kırıklarında DNA ipliklerinin her ikisi, önce, DNA'yı 5'den 3' yönünde yıkan nükleazlar ile yıkılarak tek iplikli uçlar elde edilir. Bu tek iplikler daha sonra, homolog baz eşleşmesi ile diğer atasal moleküle geçer. Boşluklar daha sonra onarım sentezi ile doldurulur ve daha önce tanımlandığı gibi, iplikler, rekombinant ve non-rekombinant heterodupleks moleküller oluşturacak şekilde, çift Holliday kavşaklı bir molekül verecek biçimde bağlanır.

Homolog Rekombinasyonda Görevli Enzimler

Bugün bilinen rekombinasyonda görevli enzimlerin çoğu, rekombinasyon - hasarlı *E.coli* mutantlarının analizi ile ilk kez tanımlanmıştır. Benzer genetik analizler, rekombinasyon için, DNA metabolizmasında farklı noktalarda rol alan proteinlere (DNA polimeraz, ligaz, ve tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler gibi) ek olarak spesifik enzimlerin gerektiğini ortaya koymuştur. *E.coli*'de etkin bir rekombinasyon için gerekli genlerin tanımlanması, kodladıkları proteinlerin izolasyonuna ve hücresiz sistemlerde



Şekil 5.36 Çift iplik kırıklarıyla rekombinasyonun başlaması
Çift iplik kırıklarda DNA'nın her iki ipliği 5'den 3' yönünde sindirilir. Daha sonra tek iplikler homolog baz eşleşmesi ile diğer atasal moleküle atlar. Boşluklar daha sonra onarım senteziyle doldurulur ve bağlanarak çift Holliday kavşağı elde edilir.



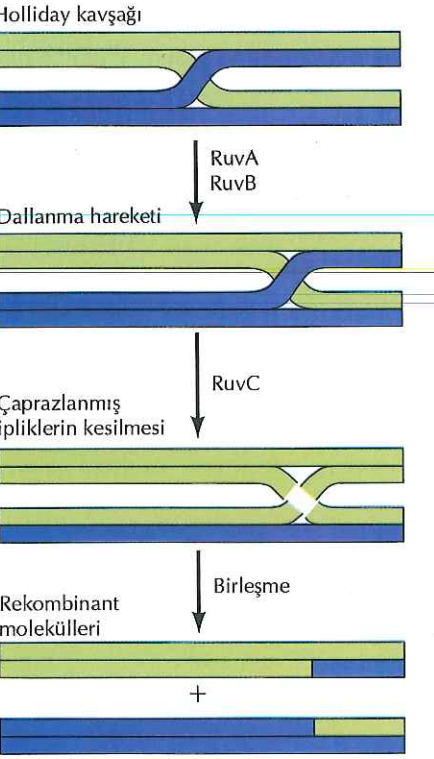
Şekil 5.37 RecA proteininin işlevi
RecA başlangıçta protein-DNA ipliği oluşturmak üzere tek iplik DNA'ya bağlanır. Tek iplik DNA'yı kaplayan RecA proteini daha sonra, ikinci bir çift iplikli DNA'ya bağlanarak baz eşleşmesiz bir kompleks oluşturur. Bunu, tamamlayıcı baz eşleşmesi ve iplik değişimi izler ve heterodupleks bölge oluşur.

biyokimyasal analizlerle tanımlanmalarına önayak olmuştur. Bu çalışmalar, Holliday kavşağının oluşum ve çözülümünü katalizleyen bazı enzimlerin etkinliğini aydınlatmıştır.

Homolog rekombinasyonla ilişkili esas protein, heterodupleks oluşturmak üzere homolog DNA'lar arasında iplik değişimini sağlayan **RecA**'dır (Şekil 5.37). RecA'nın etkinliği üç basamakta incelenebilir. İlk olarak, RecA tek iplikli DNA'ya bağlanır ve protein-DNA filamanı oluşturacak şekilde DNA'yı kaplar. RecA iki bağlanma bölgesi barındırdığından, tek iplik DNA'ya bağlı RecA proteini ikinciye, çift iplikli bir DNA molekülüne, bağlanabilir ve iki DNA arasında kompleks oluşturur. Özgül olmayan bu RecA aracılıklı bağlanmayı, tek iplik DNA ile komplementeri arasında özgül baz eşleşmesi izler. Daha sonra RecA proteini iplik değişimini katalizler ve RecA ile kaplı olan iplik, heterodupleks oluşturmak üzere homolog ipliğiyle yer değiştirir. Böylelikle RecA proteini kendi başına, Holliday kavşağı oluşumuna esas teşkil eden iplik değişim reaksiyonunu katalizleme kapasitesindedir.

Mayalarda, çift iplik kırıklarının onarımı ve rekombinasyon için, RAD51 olarak simgelenen RecA'ya benzer bir protein gereklidir. RAD51 RecA'ya yalnızca yapısal olarak benzemez, RecA gibi, *in vitro* olarak iplik değişim reaksiyonunu da katalizler. RAD51 benzeri proteinler, insan dahil kompleks ökaryotlarda tanımlanmıştır. Bu da, RecA benzeri proteinlerin hem prokaryot hem de ökaryotlarda homolog rekombinasyonda anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Holliday kavşağı bir kez oluşunca, diğer üç *E.coli* proteininden (Ruv A, B ve C) oluşan bir kompleks rekombinasyonda rol alır (Şekil 5.38). RuvA Holliday kavşağını tanır ve RuvB yi göreve çağırır. RuvB DNA ipliklerinin çapraz yaptığı bölgenin ileri-geri hareketinde motor görevi yaparak heteroduplekS bölgenin uzunluğunu ve kesişen DNA ipliklerinin kesilip yeniden birleştirileceği noktayı belirler. Daha sonra RuvC çaprazlanmış DNA iplikleri keserek Holliday kavşağını çözer. Kesik ipliklerin yeniden birleşmesiyle süreç tamamlanır ve iki rekombinant molekül elde edilir. Ökaryot hücreler *E.coli*'nin RuvA, B ve C proteinlerinin benzerlerine sahip değildir. Ökaryot hücrelerde Holliday kavşağının çözülümü, henüz tam olarak tanımlanmamış diğer proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir.



Şekil 5.38 Holliday kavşağının hareketi ve çözülmesi
RuvA Holliday kavşağını tanır ve çaprazlanmış iplik bölgesinin hareketini katalizleyen RuvB'yi sürece dahil eder. RuvC çaprazlanmış iplikleri keserek Holliday kavşağını çözer ve kesilen uçlar ligaz tarafından birleştirilir.

DNA Yeniden Düzenlenmeleri

Homolog rekombinasyon, genom içerisinde genlerin düzenini değiştirmeden, kromozom çiftleri arasında genlerin yeniden dağılımını sağlamaktadır. Bunun aksine, diğer tip rekombinasyon olayları genomik DNA'nın yeniden düzenlenmesine yol açmaktadır. Bazı DNA yeniden düzenlenmeleri, spesifik hücre tiplerinde, gen ekspresyonunun kontrolünde önemlidir; diğer bazıları, genetik çeşitliliğe katkıda bulunarak, evrim sürecinde rol oynayabilir.

Genlerin değişik kromozom bölgelerine hareket edebileceğinin keşfi, 1940'larda Barbara McClintock'un mısırla yaptığı çalışmalarla sağlandı. McClintock tümüyle genetik analizlere dayanarak, genom içerisinde değişik konumlara hareket edip, yakınındaki genlerin ekspresyonunu değiştiren, yeni bir genetik eleman tanımladı. McClintock'un çalışmalarının fiziksel temelinin bakterilerde yer değiştirebilen elemanların keşfi ile aydınlatılması ve hareket eden genetik eleman fikrinin bilim adamlarınca benimsenmesi için, neredeyse otuz yıl geçti. McClintock tarafından ilk kez tanımlanan elemanların yer değiştirmesi dahil, DNA yeniden düzenlenmelerinin bir kaç tipi bu gün hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde tanımlanmıştır. Hatta şimdi, yer değiştirebilen elemanların bitki ve hayvanlarda genomların geniş bölümünü oluşturduğu, insan genomunun neredeyse yarısını kapsadığı bilinmektedir.

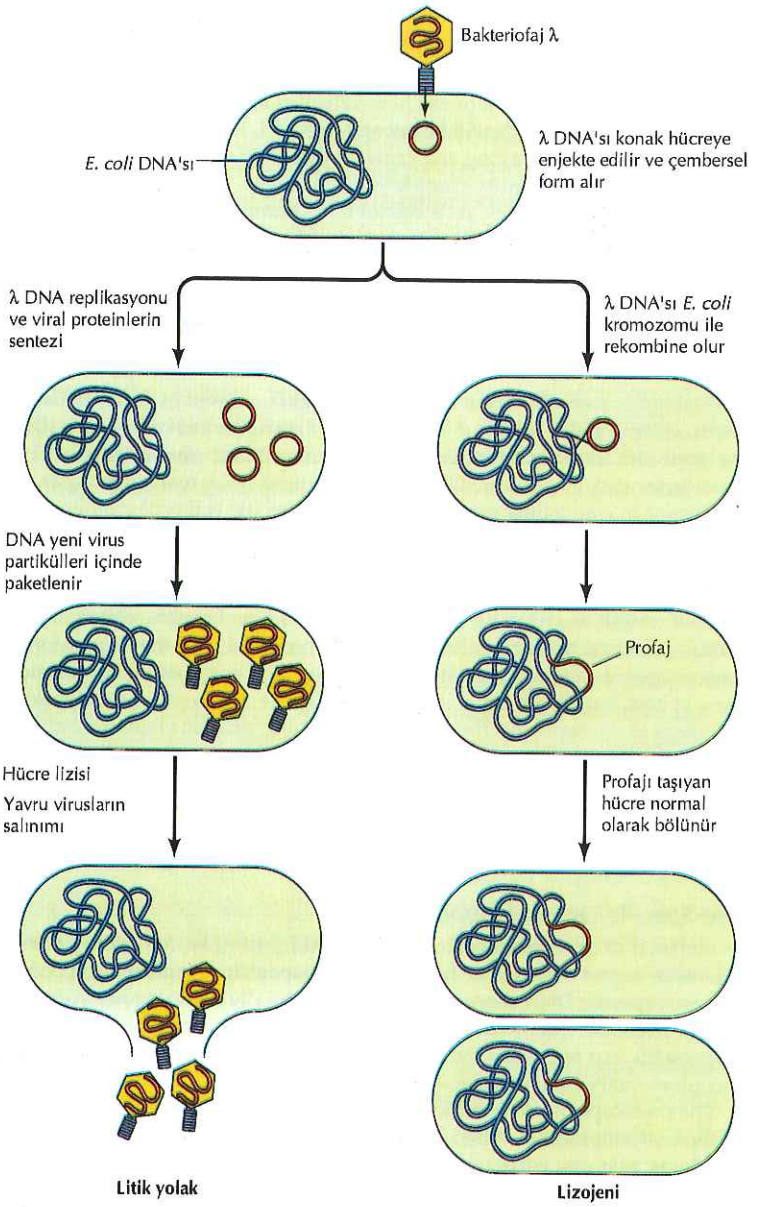
Bölgeye-Özgül Rekombinasyon

Herhangi bir geniş homolog dizin bölgesinde görülebilen genel homolog rekombinasyonun aksine, **bölgeye-özgül rekombinasyon** çoğunlukla, sadece kısa bir DNA bölgesinde homolog olan özgül DNA dizileri arasında gerçekleşir. Bu süreçte esas etkileşim, tamamlayıcı baz eşleşmesi ile değil, özgül hedef DNA dizilerini tanıyan proteinlerce gerçekleştirilir.

Bölgeye-özgül rekombinasyonun prototipi bakteriyofaj λ ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. λ *E.coli*'yi enfekte ettiğinde, ya çoğalarak hücreyi eritir (lizis) ya da, daha sonra *E.coli* genomunun bir

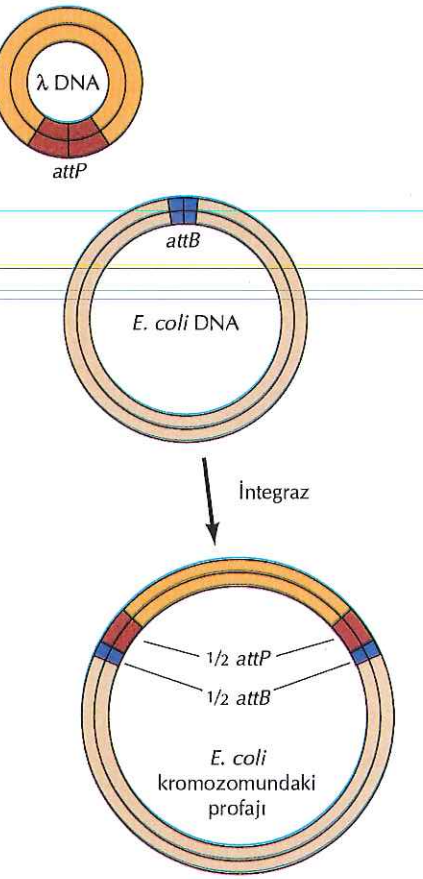
parçası olarak kalan profajı oluşturmak üzere, bakteri kromozomuna katılır (**lizojeni**) (Şekil 5.39). Uygun koşullarda DNA katılımı tersine dönebilir ve λ DNA'sının kesilip çıkarılması ve litik viral replikasyonun başlamasıyla sonuçlanır. Hem entegrasyon hem de λ DNA'nın kesilip-çıkarılması, virus ve konakçı hücre DNA dizileri arasında bölgeye-özgül rekombinasyonu gerektirir.

E.coli DNA'sı ile λ DNA'sı, tutunma (attachment =*att*) bölgesi olarak adlandırılan özel bir bölgede birleşir. λ DNA'sının entegrasyonu, sırasıyla, 240 ve 25 nükleotid uzunluktaki faj (*attP*) ve bakteri (*attB*) *att* bölgeleri arasında rekombinasyonu gerektirmektedir (Şekil 5.40). Bu süreç, *attP* ve *attB* bölgelerine spesifik olarak bağlanan ve integraz (Int) olarak adlandırılan bir λ proteini tarafından yürütülür. Int önce *attP*'ye bağlanarak, *attP* DNA'nın çok sayıda Int

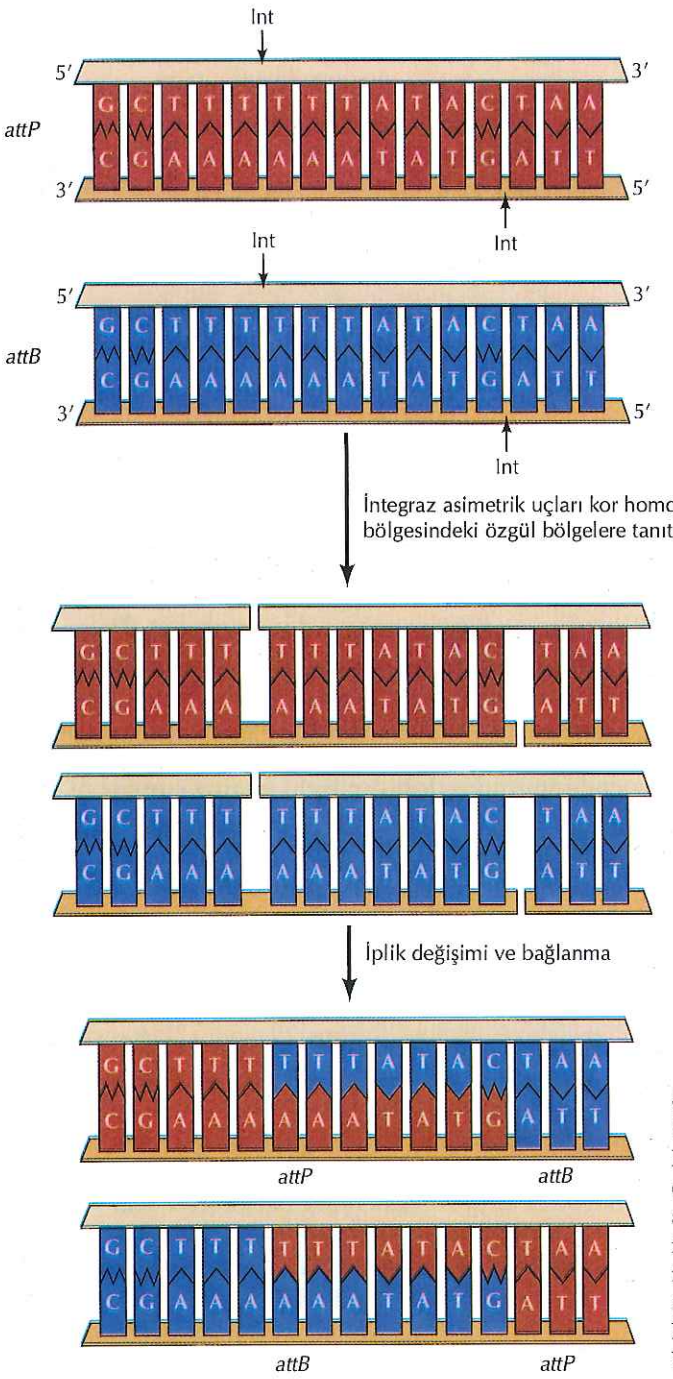


Şekil 5.39 Bakteriyofaj λ'nın litik ve lizojenik yolakları
E.coli'nin enfeksiyonu, konakçı hücrede çembersel form alan λ DNA'sının enjeksiyonuyla başlar. Litik enfeksiyonda λ DNA replike olur ve viral proteinlerin sentezini yönlendirir. Viral DNA daha sonra, hücrenin erimesiyle serbest kalacak olan yavru virus partikülleri içerisine paketlenir. Lizojenik enfeksiyonda λ DNA'sı, *E.coli* kromozomu içerisine katılmış profajı oluşturmak üzere, konakçı genomuyla rekombinasyon yapar. Genoma katılmış λ DNA yavru virusların sentezini gerçekleştirmez, bakteri genomuyla birlikte replike olur.

protein kopyasının etrafına dolandığı bir kompleks oluşturur. Int-*attP* kompleksi *attB*'ye bağlanarak faj ve bakteri *att* bölgelerini bir hizaya getirir. Ardından, faj ve bakteri, *attB* ve *attP* tarafından paylaşılan 15 nükleotidlik bir çekirdek dizi içerisinde karşılıklı iplik değiştirirler (Şekil 5.41). Int proteini *attB* ve *attP*'nin çekirdek homoloji bölgesi içinde asimetrik kesik oluşturur, karşılıklı iplik değişimini katalizler ve daha sonra kırık iplikleri bağlayarak λ DNA'yı *E.coli* kromozomuna katar. Int proteini, katılımın geri dönüşümü olan, λ profajın çıkarılmasında da rol oynar.



Şekil 5.40 λ DNA'nın bölgeye-özgül rekombinasyon ile katılımı
Katılım λ ve *E.coli* genomlarının, sırasıyla, *attP* ve *attB* olarak adlandırılan özgül dizileri arasında rekombinasyonun sonucudur. Süreç virus tarafından kodlanan ve *attP* ve *attB* dizilerinin her ikisini de tanıyan bir enzim (integraz) tarafından katalizlenir.



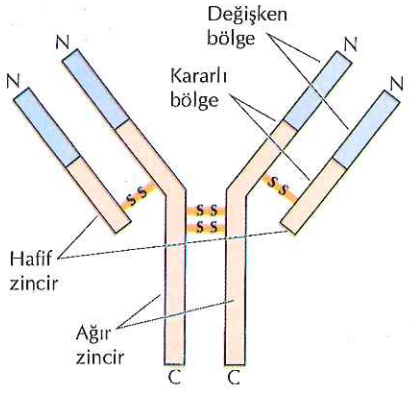
Şekil 5.41 λ bölgeye-özgül rekombinasyon mekanizması
Bölgeye-özgül rekombinasyon, *attP* ve *attB* için ortak olan 15 nükleotidlik homolog çekirdek diziler arasında meydana gelir. İntegraz (Int) bu dizi içerisinde özgül bir bölgeden keserek, asimetrik tek iplik DNA kuyrukları oluşturur. Daha sonra *attP* ve *attB* arasında rekombinasyonu ve λ DNA'nın katılımını gerçekleştirmek üzere, iplik değişimini ve bağlanmayı katalizler.

Bölgeye-özgül rekombinasyon yalnızca λ gibi virusların konak hücrelerle etkileşmesi için değil, hücre genomlarında programlanmış gen yeniden düzenlenmeleri için de önemlidir. Bölgeye-özgül rekombinasyon omurgalılarda, yabancı maddeleri (**antijenler**) tanıyarak enfektif ajanlara karşı korunma sağlayan bağışıklık sisteminin gelişiminde önemlidir. B ve T lenfositler tarafından yönlendirilen iki ana immün yanıt tipi vardır. B lenfositler çözünen antijenlerle tepkimeye giren antikorları (**immünglobulinler**) salgılarlar; T lenfositler ise, diğer hücrelerin yüzeylerinde sergilenen antijenlerle reaksiyona giren hücre yüzey proteinlerini (**T hücre reseptörleri** olarak adlandırılan) üretirler. İmmünglobulinlerin ve T hücre reseptörlerinin her ikisinin temel özellikleri, çok geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarıdır, bu sayede pek çok farklı yabancı antijeni tanıyabilen antikorlar ve T hücre antijenleri oluşabilmektedir. Örneğin, her birey 10^{11} den fazla değişik antikor molekülü üretebilme kapasitesine sahiptir ki bu sayı, insan genomunda yer alan genlerin toplam sayısının (30,000-40,000) çok üzerindedir. Bu çok çeşitli antikorlar (ve T hücre reseptörleri) germ hattı DNA'sında kodlanmaz, bağışıklık sisteminin gelişim sırasında, T hücre reseptör ve immünglobulin genlerinin farklı bölgeleri arasında bölgeye-özgül rekombinasyon ile oluşan, eşsiz lenfosit genlerince kodlanmaktadır.

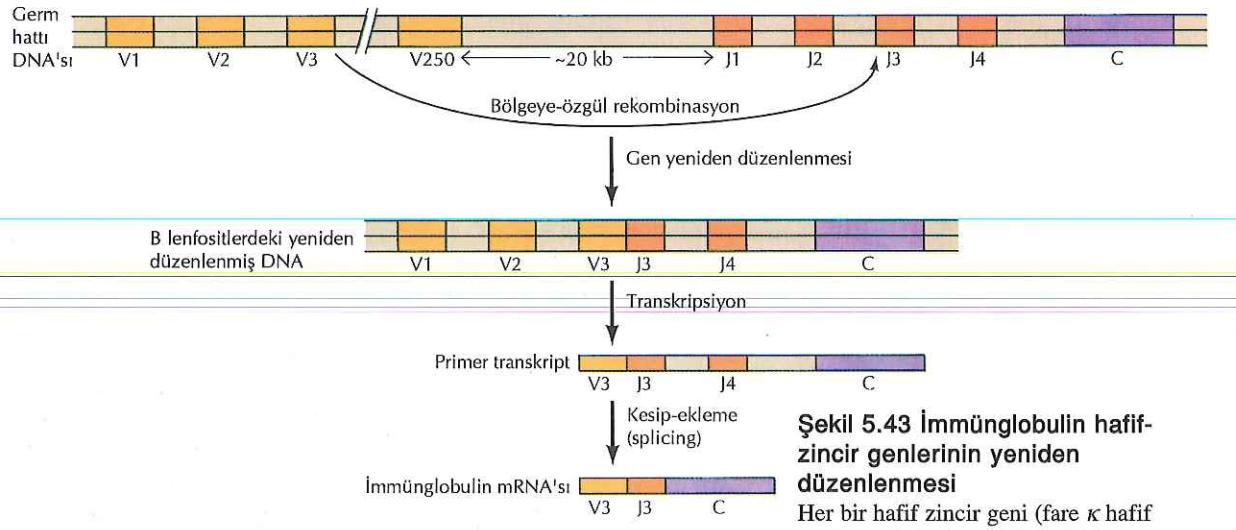
İmmünglobulin genlerinin yapılanmasında bölgeye-özgül rekombinasyonun rolü, 1976'da Susumu Tonegawa tarafından ilk kez gösterildi. İmmünglobulinler, birbirinin aynı ağır ve hafif polipeptid zincir çiftlerinden oluşur (Şekil 5.42). Hem ağır hem de hafif zincirler, kararlı (constant) C-ucu bölgeler ile değişken (variable) N-ucu bölgelerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Farklı immünglobulin moleküllerinde farklı amino asitleri barındıran değişken bölgeler, antijen bağlama görevi yapan kısımlardır ve her farklı antikorun tek bir antijeni tanınmasının sebebi değişken bölgedeki amino asit dizilerinin değişkenliğidir. Her bireyin çok geniş bir dağılımda farklı antikorlar üretme yeteneğine karşın, her B lenfosit yalnızca tek tip antikor üretir. Tonegawa'nın önemli buluşu, her bir antikorun B lenfosit gelişimi sürecinde bölgeye-özgül rekombinasyon ile oluşturulmuş münferit genlerce kodlanmasıdır. Bu gen yeniden düzenlenmeleri, her bir B lenfositte farklı immünglobulin genleri oluşturur ve böylece, insan vücudunda yaklaşık 10^{12} B lenfositlik bir populasyon, çok geniş bir yelpazede yabancı antijene karşı antikor üretebilme kapasitesi sağlar.

İmmünglobulin hafif zincirini kodlayan genler üç bölgeden oluşur: polipeptid değişken bölgesinin 95 ila 96 N-terminal amino asidini kodlayan bir V bölgesi; polipeptid değişken bölgesinin C-ucundaki 12 ila 14 amino asidi kodlayan bir bağlantı (J) bölgesi; ve polipeptid kararlı bölgesini kodlayan bir C bölgesi (Şekil 5.43). Farede hafif zincir genlerinin majör tipi yaklaşık 250 V, dört J ve bir tek C bölgesinin kombinasyonuyla oluşur. Lenfosit gelişimi sürecinde bölgeye-özgül rekombinasyon, fonksiyonel bir hafif zincir geni oluşturmak üzere, tek bir V bölgesinin tek bir J bölgesiyle rekombinasyonunu sağlar. Farklı B lenfositlerde değişik V ve J bölgeleri rekombinasyonla birleştirilebildiğinden, 250 V bölgesinin 4 J bölgesiyle oluşturacağı hafif zincir kombinasyonu olasılığı yaklaşık 1000 (4x250) dir.

Ağır-zincir genleri, V ve J arasında yer alan amino asitleri kodlayan, dördüncü bir bölgeye (değişkenlik veya D bölgesi olarak bilinir) sahiptir (Şekil 5.44). İşlevsel bir ağır zincir genin kurulumu iki rekombinasyon olayını gerektirir: Önce bir D bölgesi bir J bölgesiyle birleşir ve daha sonra bir V bölgesi, düzenlenmiş olan DJ parçasına



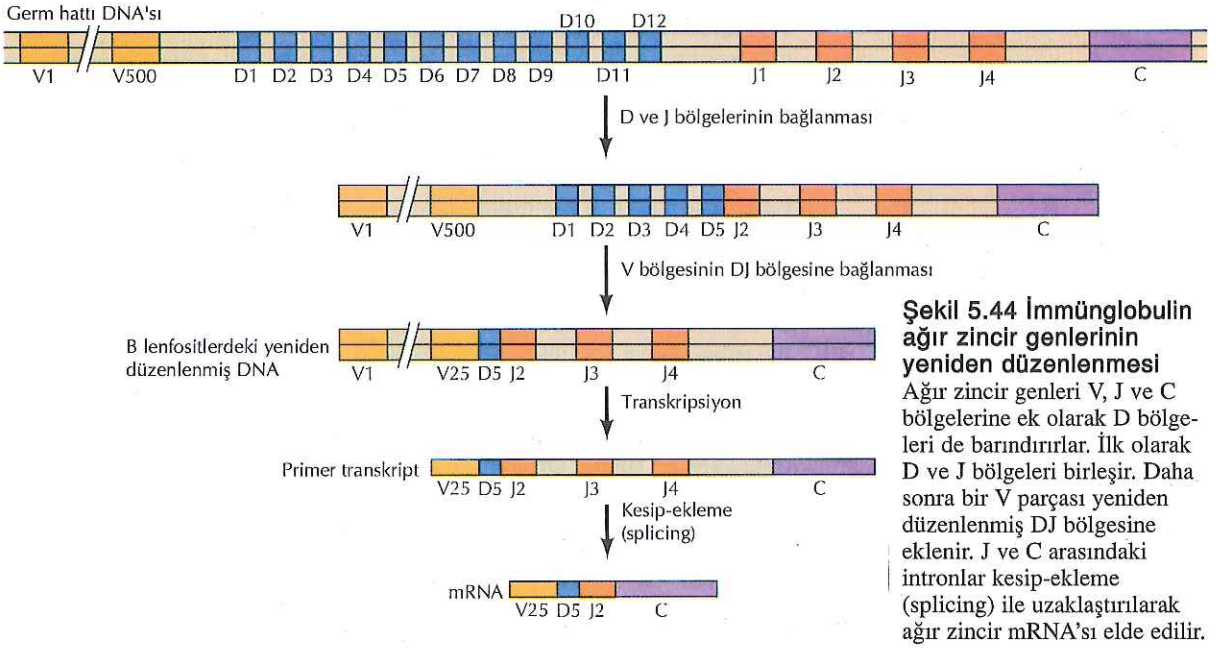
Şekil 5.42 Bir immünglobulinin yapısı
İmmünglobulinler iki hafif ve iki ağır zincirin disülfit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşurlar. Ağır ve hafif zincirlerin her ikisi de değişken ve kararlı bölgeler içerir.



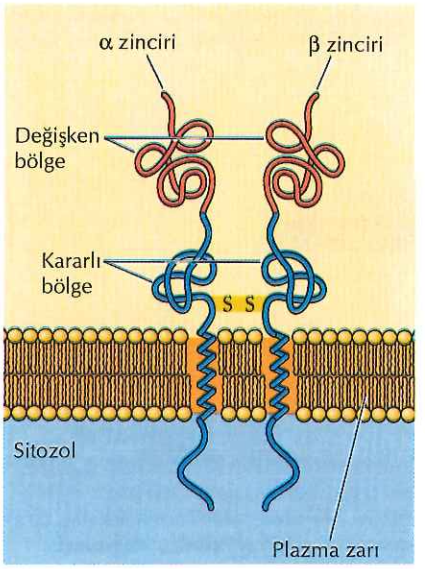
Şekil 5.43 İmmünglobulin hafif-zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi
Her bir hafif zincir geni (fare κ hafif zincir geni görülmektedir), bir kararlı bölge (C), bir bağlantı bölgesi (J) ve bir değişken bölgeden (V) oluşur. Germ hattı DNA'sında J ve C'den yaklaşık 20 kb uzakta, 250 farklı V bölgesi bulunur. B lenfosit gelişimi sürecinde, bölgeye-özgül rekombinasyon V bölgelerinden birini dört J bölgesinden birine bağlar. Yeniden düzenleme transkripsiyonu aktive eder ve sonuçta, yeniden düzenlenmiş VJ bölgesiyle birlikte, kalan J bölgelerini ve C'yi kapsayan bir primer transkript oluşur. Kullanılmayan J bölgeleri ile, J ve C arasındaki intronlar kesip-ekleme (splicing) ile uzaklaştırılarak işlevsel mRNA elde edilir.

bağlanır. Farede yaklaşık 500 ağır zincir V bölgesi, 12 D bölgesi, ve 4 J bölgesi vardır, buna göre, rekombinasyon ile oluşabilecek ağır zincir çeşidi sayısı 24,000 (500x12x4)'dir.

Bölgeye özgül rekombinasyon ile oluşmuş 1000 değişik hafif zincir ve 24,000 değişik ağır zincirin oluşturacağı kombinasyonlarla yaklaşık $2x10^7$ değişik immünglobulin molekülü oluşturulabilir. İmmünglobulin gen parçalarının bağlanmasında sıklıkla bir ya da birkaç nükleotidin eklenme veya kaybı ile bu çeşitlilik daha da artmaktadır. Bu delesyon ve eklenmelerden kaynaklanan mutasyonlar immünglobulin değişken bölgelerin çeşitliliğini, 10^5 civarında farklı hafif zincir ve $2x10^6$ ağır zincirin oluşumuna yansıyacak şekilde, yaklaşık yüz kat artırmaktadır ve ağır ve hafif zincir



Şekil 5.44 İmmünglobulin ağır zincir genlerinin yeniden düzenlenmesi
Ağır zincir genleri V, J ve C bölgelerine ek olarak D bölgeleri de barındırırlar. İlk olarak D ve J bölgeleri birleşir. Daha sonra bir V parçası yeniden düzenlenmiş DJ bölgesine eklenir. J ve C arasındaki intronlar kesip-ekleme (splicing) ile uzaklaştırılarak ağır zincir mRNA'sı elde edilir.



Şekil 5.45 T hücre reseptörünün yapısı
T hücre reseptörleri plazma zarını kat eden, disülfit bağlarıyla bağlı iki polipeptid zincirinden (α ve β) oluşur. a ve b zincirlerinin her ikisi de değişken ve kararlı bölgelerden oluşmuştur.

kombinasyonlarıyla 10^{11}'den daha fazla farklı antikor oluşabilecektir. Yeni düzenlenme sonrasında antikor çeşitliliği, somatik hiper mutasyon olarak bilinen ve gerek hafif gerekse ağır zincirlerin değişken bölgelerinde sık mutasyon oluşumuna neden olan mekanizma sayesinde daha da artar.

T hücre reseptörleri de benzer şekilde, her biri kararlı ve değişken bölgeler içeren iki zincirden (α ve β olarak adlandırılır) oluşmuştur (Şekil 5.45). Bu polipeptidleri kodlayan genler, immünglobulin genlerinin oluşumuna benzer bir biçimde V ve J bölgeleri (α zincir) veya V, D ve J bölgeleri (β zincir) arasında rekombinasyonla oluşur. DNA'nın bu farklı bölgeleri arasındaki bölgeye özgül rekombinasyon ve rekombinasyon sürecinde oluşan mutasyonlar, immün globulinlerdekine benzer biçimde, T hücre reseptörlerinde çeşitliliğin derecesini belirler. Bununla birlikte T hücre reseptörleri, immünglobulinlerdeki tarzda somatik hipermutasyon ile daha ileri değişikliğe uğramazlar.

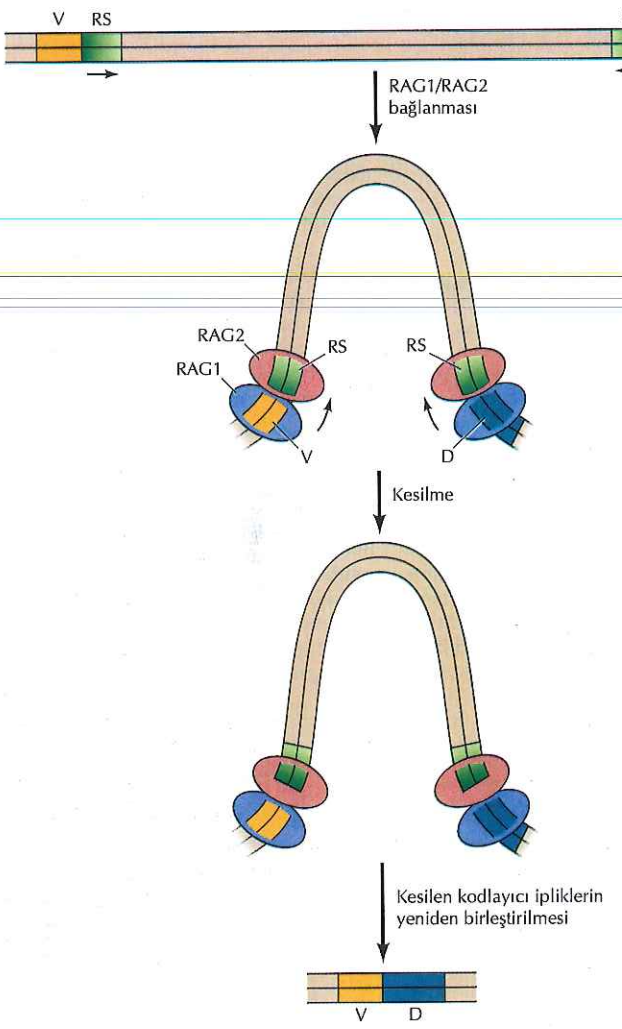
VDJ rekombinasyonu, özgül olarak lenfositlerde eksprese olan, RAG1 ve RAG2 olarak adlandırılan iki proteinin oluşturduğu kompleks aracılığıyla gerçekleşir. RAG proteinleri her gen bölgesinin kodlayıcı dizilerine komşu rekombinasyon sinyal dizilerini (RS) tanır ve kodlayıcı diziler ile RS dizileri arasında çift iplik kırıkları oluşturarak, DNA yeniden düzenlenmelerini başlatır (Şekil 5.46). Gen bölümlerinin kodlayıcı uçları daha sonra düzenlenmiş immünglobulinleri veya T hücre reseptörlerini verecek şekilde bağlanırlar, bağlanma reaksiyonu sırasında, sıklıkla, nükleotid kazanım veya kayıpları meydana gelir. Bu bölümde daha ilerde tartışılacağı gibi RAG1, retrovirus entegrasyonunu ve DNA transpozisyonunu katalizleyen enzimlerle yakın benzerlik gösterir.

DNA Aracılar ile Transpozisyon

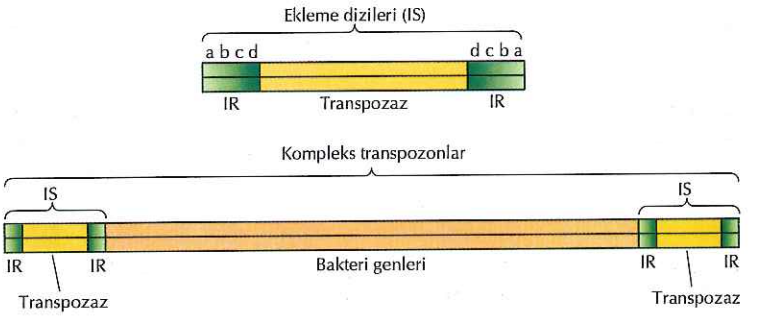
Bölgeye-özgül rekombinasyon, en azından küçük bir homolog bölge barındıran iki spesifik dizi arasında meydana gelir. Bunun aksine **transpozisyon** ise, dizilerin genom boyunca hareketini içerir ve herhangi bir dizi homolojisini gerektirmez. McClintock tarafından ilk kez tanımlananlar gibi transpozisyon ile hareket eden elemanlar, **yer değiştirebilen (transposable) elemanlar** veya **transpozonlar** olarak adlandırılırlar. DNA ya da RNA aracılığıyla yer değiştirmelerine göre iki genel sınıfa ayrılırlar. Yer değiştirebilen elemanların ilk sınıfı burada tartışılmakta, RNA aracılıklı yer değiştirme bir sonraki kısımda ele alınacak.

Ayrıntılı olarak tanımlanan ilk transpozon grubu, DNA aracılığıyla hareket eden bakteri transpozonlarıdır (Şekil 5.47). Bu elemanların en basiti 800 ila 2000 nükleotid büyüklükte olan ekleme (insersiyon) dizileridir. Ekleme dizileri, yer değiştirme için gerekli bir enzimin geni (transpozaz) ile, onu sınırlayan, transpozazın etkileyeceği kısa ters tekrar dizilerinden oluşur. Kompleks transpozonlar, diğer genleri sınırlandırılan ve bir birim olarak hareket eden iki ekleme dizisinden oluşur.

Ekleme dizileri bir kromozomal bölgeden diğerine DNA'larını replike etmeden hareket ederler (Şekil 5.48). Transpozazlar hedef DNA'da asimetrik kesim oluşturur ve transpozonu ters tekrar



Şekil 5.46 VDJ rekombinasyonu
İmmünglobulin ve T hücre reseptörlerinin kodlayıcı bölgeleri (örn., bir V ve D bölgesi) iki yandan, kodlayıcı dizilerin 5' ve 3' uçlarında zıt yönelimde yerleşik, kısa rekombinasyon sinyal (RS) diziler ile sınırlanmıştır. RS dizileri, DNA'yı kodlayıcı bölge ve RS dizileri arasından kesen, lenfosit spesifik rekombinasyon proteinleri RAG1 ve RAG2 kompleksi tarafından tanınırlar. Kesilen kodlayıcı iplikler daha sonra, yeniden düzenlenmiş bir gen bölümü oluşturacak şekilde birleşirler.



Şekil 5.47 Bakteri transpozonları
Ekleme dizileri (IS) 800-2000 nükleotid arasında değişir ve yaklaşık 20 nükleotidlik ters tekrarlar (IR) ile kuşatılmış transpozaz genini kapsar. Kompleks transpozonlar diğer genleri sınırlayan iki ekleme dizisi içerirler ve tipik olarak 5-20 kb uzunluktadırlar.

ANAHTAR DENEY

İmmünglobulin Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi

Evidence for Somatic Rearrangement of Immunoglobulin Genes Coding for Variable and Constant Regions

Nobumichi Hozumi and Susumu Tonegawa
Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 73, 1976, pages 3628-3632

Bağlam

Omurgalı immün sisteminin sonsuz gibi gözüken yabancı molekülleri tanıyabilmesi, lenfositlerin buna uygun olarak, çok çeşitli antikor üretebildiği anlamına gelmektedir. Antikor çeşitliliği immün tanımanın anahtarı olduğundan, genomik DNA'da sınırsız sayıda farklı immünglobulinin kodlanma mekanizmasının anlaşılması immünolojinin temel konusunu oluşturmaktadır.

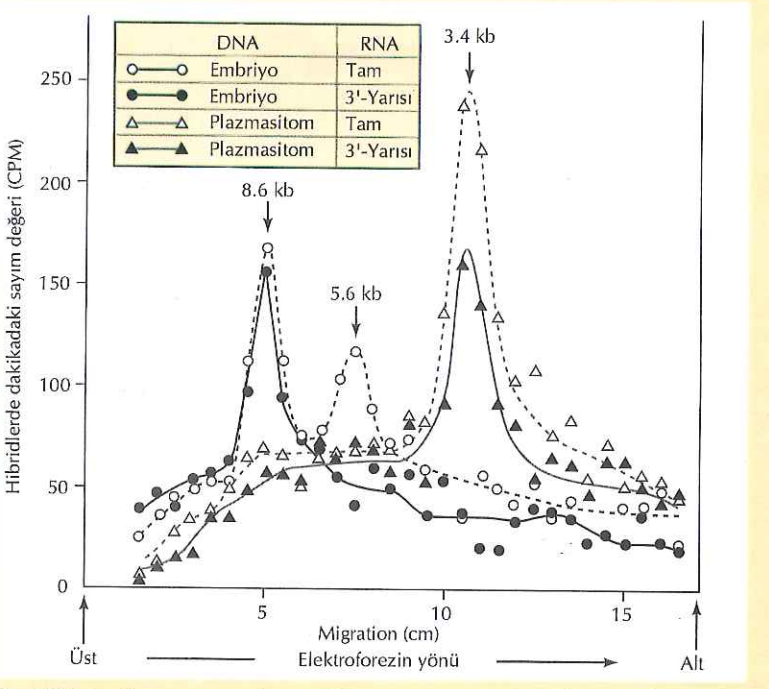
Hozumi ve Tonegawa'nın deneylerinden önce immünglobulinlerin protein dizi analizi, ağır ve hafif zincirlerin her ikisinin de ayrı, ayrı değişken ve kararlı bölgeler içerdiklerini göstermiştir. Genetik çalışmalar farelerin, kararlı-bölge genlerinin yalnızca tek kopyasını kalıttığını göstermiştir. Bu gözlem, immünglobulinlerin tek bir kararlı bölge ile bağlanan çok sayıda değişken bölge genlerince kodlandığı şeklinde bir öneriyi gündeme getirmiştir. Hozumi ve Tonegawa tarafından immünglobulin gen yeniden düzenlenmelerinin keşfi, bu hipoteze ilk direkt deneysel desteği sağlamış ve antikor çeşitliliğinin moleküler temellerinin anlaşılması için altyapı oluşturmuştur.

Deneyler

Hozumi ve Tonegawa, immünglobulin değişken ve kararlı bölgelerini kodlayan genlerin, lenfosit gelişimi sürecinde, DNA düzeyinde birleşme olasılığını test ettiler. Deneysel yaklaşımları, fare plazmasitom (tek tip immünglobulin üreten bir B lenfosit tümörü) hücreleri ve fare embriyolarından elde ettikleri DNA'larda değişken ve kararlı bölge dizilerinin organizasyonlarının restriksiyon enzimler kullanılarak karşılaştırılmasıydı.

Embriyo ve plazmasitom DNA'ları, *Bam*HI restriksiyon enzimi ile kesildi ve değişik büyüklükteki DNA parçaları agaroz jellerde elektroforez ile ayrıldı. Jel daha sonra ince dilimlere kesildi ve her dilimden izole edilen DNA, plazmasitom hücrelerinden izole edilen immünglobulin mRNA'sından hazırlanmış olan radyoaktif işaretli problar ile hibridize edildi. Birisi tüm immünglobulin mRNA'sını, diğeri mRNA'nın yalnızca kararlı bölge dizilerini barındıran 3' yarısını kapsayan iki prob kullanıldı.

Önemli bulgu, embriyo ve plazmositom DNA'larında kararlı bölge ve değişken bölge dizilerinin tümüyle farklı düzende olduğunun saptanmasıydı (şekle bakınız). Embriyo DNA'sında tam prob, sırasıyla, yaklaşık 8.6 ve 5.6 kb'lık iki *Bam*HI fragmanı ile hibridize oldu. Yanlızca 8.6 kb'lık fragman 3' probu ile hibridize oldu ki bu, 8.6 kb'lık fragmanın kararlı bölge dizilerini barındırdığını ve 5.6 kb'lık



BamH1 ile kesilen ve plazmasitom mRNA sının tamamına ya da 3' yarısına karşı gelen problarla hibridize edilen embriyo ve plazmasitom DNA'larının jel elektroforezi. Sonuçlar, her jel diliminde, DNA ile hibridleşen moleküllerde belirlenen radyoaktivite olarak gösterildi.

fragmanın değişken bölge dizilerini içerdiğini belirtiyordu. Çarpıcı zıtlık ise, her iki probun da plazmositom DNA'sında tek bir 3.4 kb'lık fragman ile hibridize olmasıydı. Bu sonuçlar, değişken ve kararlı bölge dizilerinin embriyoda ayrı olduğu, fakat lenfosit gelişimi sürecinde tek bir immmunglobulin geni oluşturmak üzere, yeniden düzenlenmiş olduğu şeklinde yorumlandı.

Etki

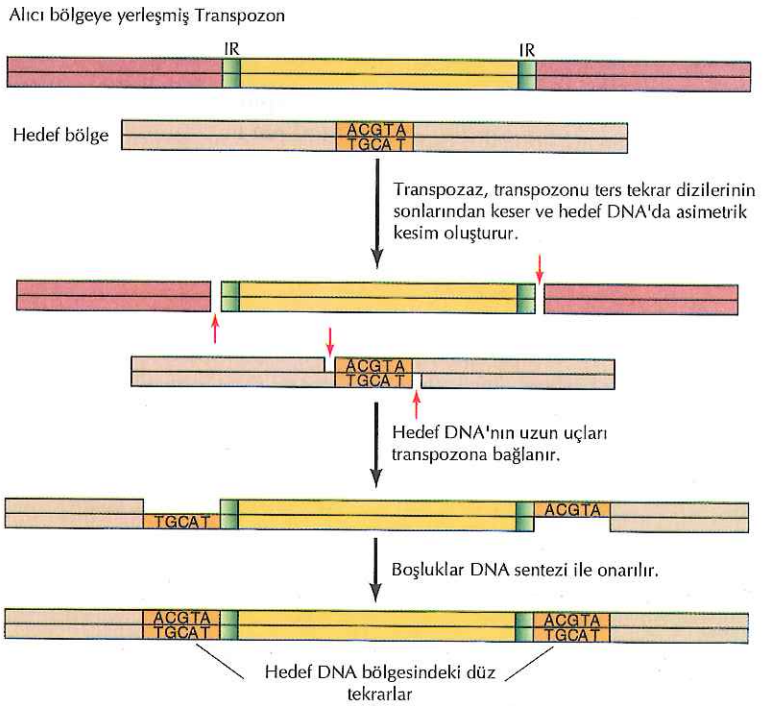
Hozumi ve Tonegawa'nın, göreceli olarak dolaylı restriksiyon endonükleaz haritalamaya dayalı ilk sonuçları, immünglobulin genlerinin dizi analizleri ve moleküler klonlama çalışmaları ile doğrulandı ve detaylandırıldı. Benzer çalışmalar bu gün, bu genlerin B lenfositlerde DNA'nın farklı bölgeleri arasında bölgeye-özgül rekombinasyon ile bir araya geldiklerini, şüpheye yer bırakmayacak şekilde göstermiştir. T lenfositlerde benzer DNA yeniden düzenlenmeleri, T hücre reseptörlerini kodlayan genlerin oluşmasını sağlar. Böylece, bölgeye-özgül rekombinasyon ve programlanmış gen yeniden düzenlenmeleri immün sistemin gelişiminde temel oluşturur.

Daha ileri çalışmalar, immünglobulin ve T hücre reseptörlerinin değişken bölgelerinin, DNA'nın iki veya üç farklı bölümünün yeniden düzenlenmesiyle oluştuğunu göstermiştir. Bu bölümlerin yeniden bir araya gelebilmeleri, rekombinasyon bölgesindeki yüksek mutasyon frekansıyla birlikte, T hücre reseptör ve immünglobulin çeşitliliğinin oluşumundan büyük ölçüde sorumludur. İmmünglobulin genlerinin yeniden düzenlenmesinin keşfi, immün sistemin yabancı maddeleri ne şekilde tanıyıp, neredeyse sınırsız miktarda yanıt oluşturabildiğinin anlaşılmasına temel oluşturmuştur.

Donna Coveney/MIT

Susumu Tonegawa

dizilerinin sonlarından keser. Transpozazlar her ne kadar transpozon ters tekrarları üzerinde spesifik olarak etki ediyorsa da, çoğunlukla hedef DNA dizileri açısından daha az özgüldür, böylelikle transpozonların genomun her tarafına hareketini katalizlerler. Transpozonların ve hedef bölge DNA'sının kesilmesinden sonra, transpozazlar hedef DNA'nın uzun uçlarını yer değiştirilebilen elemanlara bağlarlar. Hedef bölge DNA'sında oluşan boşluk DNA



Şekil 5.48 Ekleme dizilerinin yer değiştirmesi

Basit transpozisyon transpozon DNA'nın replikasyonunu gerektirmez. Transpozaz, transpozonu her iki ucundan keser ve hedef DNA'da asimetrik kesim oluşturur. Hedef DNA'nın uzun uçları transpozona bağlanır ve hedef bölgede asimetrik kesimle oluşan boşluklar onarılır. Sonuç, entegre olan transpozonun iki yanında, hedef-bölge DNA'sının kısa düz tekrarlarının (5 ila 10 nükleotid uzunlukta) oluşumudur.

sentezi ile onarılır ve bunu, transpozonun diğer ipliğine bağlanması izler. Bu sürecin ürünü, yer değiştiren elemanın her iki tarafında hedef bölge DNA'sının kısa birer düz tekrarının oluşmasıdır ki bu, transpozon entegrasyonunun en belirgin işaretidir.

Bu transpozisyon mekanizması transpozonun bir kromozomal bölgeden diğerine hareketine neden olur. Diğer tip transpozonlar daha kompleks mekanizmalarla hareket ederler, transpozon yeni bir hedef bölge içerisine entegre olmak üzere replike olur. Bu mekanizma ile transpozonun bir kopyası başlangıçtaki yerleşiminde kalırken, bir diğer kopyası genomda yeni bir pozisyona yerleşir.

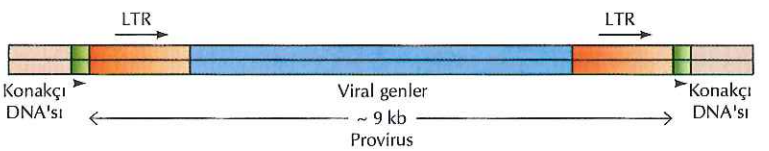
DNA aracılığıyla hareket eden transpozonlar, bakterilerin yanı sıra ökaryotlarda da bulunur. Örneğin insan genomu, yaklaşık olarak 300,000 DNA transpozon içermektedir ki bu, insan genomunun yaklaşık olarak %3'üne denktir. McClintock tarafından mısır bitkisinde ilk kez tanımlanan, yer değiştiren elemanlar, diğer birçok bitki ve hayvanlardaki yer değiştiren elemanlar gibi, replike olmadan yer değiştirirler. Bakteri transpozonları gibi, bu elemanlar da genom içerisinde birçok hedef bölgeye hareket ederler. Bu transpozonların genomda spesifik olmayan bölgelere sıçramasının o hücreye hiç bir yararı olmaz, ancak, DNA yeniden düzenlenmelerine yol açması nedeniyle evrim sürecinde önemli rol oynar.

Mayalarda ve protozoalarda ise, replikasyon yoluyla yer değiştirme, gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan programlanmış DNA yeniden düzenlenmeleri için gereklidir. Bu durumlarda transpozisyon, yer değiştiren elemanın bir kopyasının bağlanacağı hedef bölgeyi özgül olarak tanıyıp kesen endonükleazlar tarafından başlatılır. Yer değiştirebilen elemanlar sadece, genom içerisinde özgül olmayan bölgelere hareket kapasitesine değil, ayrıca, gen ekspresyonunda programlanmış değişiklikler oluşturan özgül gen yeniden düzenlenmelerine katılma özelliğine sahiptirler.

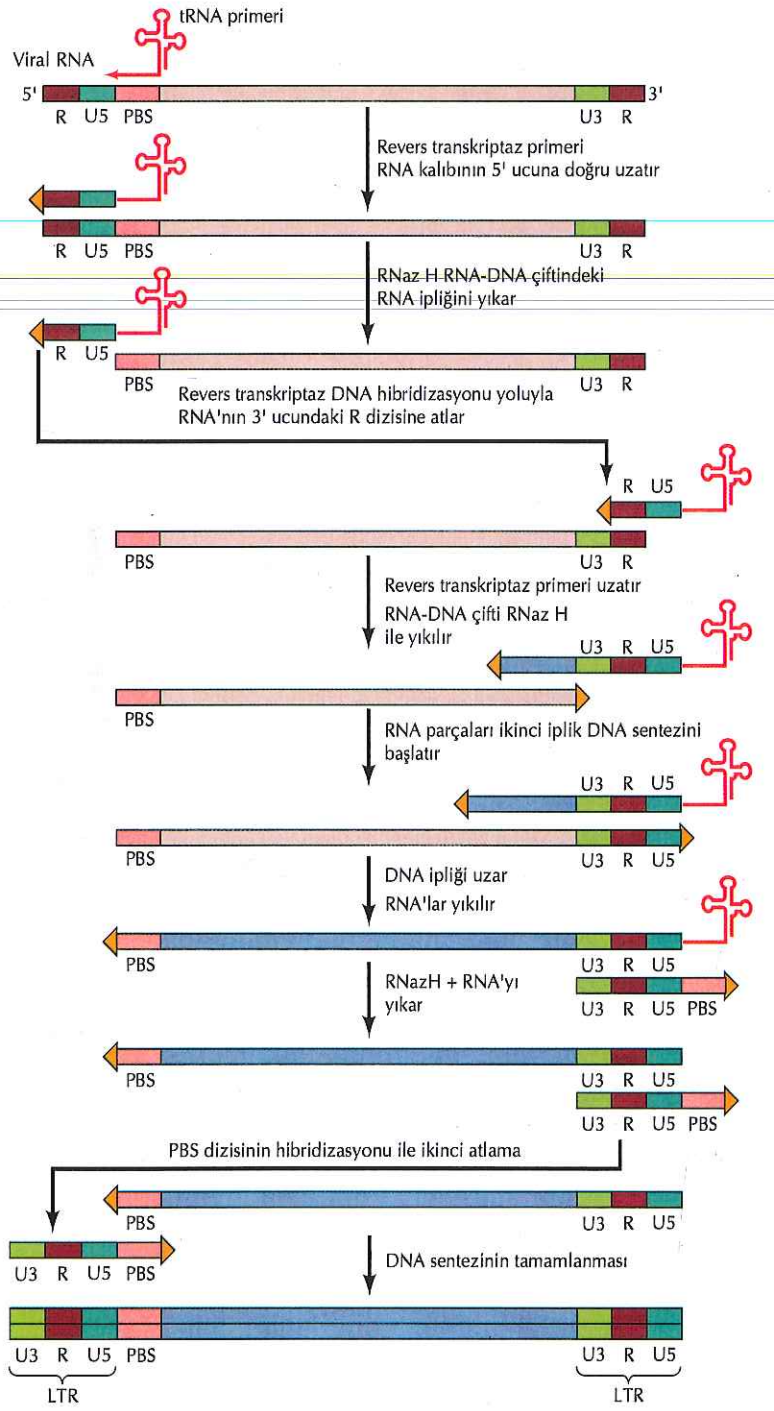
RNA Aracıları ile Transpozisyon

Ökaryot hücrelerdeki transpozonların çoğu, RNA ara ürünlerin ters transkripsiyonu ile yer değiştiren **retrotranspozonlar**dır. İnsanda, genomun %40'ından fazlasını kaplayan, 3 milyon kadar retrotranspozon kopyası bulunur (bkz. Tablo 4.1). Bu elemanların yer değiştirme mekanizması retrovirusların replikasyonuna benzer ve viruslar, hareket edebilen dizilerin bu sınıfının incelenmesi için örnek sistem oluşturur.

Retroviruslar virus partikülü içerisinde RNA genomu taşırlar, fakat, enfekte ettikleri hücrelerin kromozomal DNA'sına entegre olan bir DNA provirus sentezleyerek replike olurlar (bkz. Şekil 3.13). Viral RNA'nın bir DNA kopyası, virusa ait bir enzim olan **revers transkriptaz** ile sentezlenir. Bu mekanizma ile, her iki ucunda birkaç yüz nükleotidlik düz tekrarlar içeren bir DNA molekülü sentezlenir (Şekil 5.49). **Uzun uç tekrarları** veya **LTR**'ler olarak adlandırılan bu tekrar dizileri, viral RNA'da DNA sentezini başlatmak üzere primerlerin bağlandığı bölgelerin duplikasyonu ile oluşmuştur. LTR diziler, ters transkripsiyonda olduğu gibi, proviral DNA'nın entegrasyonunda ve bunu izleyen transkripsiyonunda önemli rol oynar.



Şekil 5.49 Retroviral DNA'nın organizasyonu
Entegre olmuş proviral DNA, birkaç yüz nükleotidlik düz tekrardan oluşan uzun uç tekrarları (LTR'ler) ile sınırlanmıştır. Revers transkriptaz, integraz ve viral partikülün yapısal proteinlerini kodlayan viral genler, LTR'lerin arasında yer alır. Entegre olmuş provirus, konakçı DNA'nın kısa düz tekrarlarıyla sınırlanmıştır.



Şekil 5.50 Ters transkripsiyon sürecinde LTR'lerin oluşumu
LTR'ler üç dizi elemanı içerirler: viral RNA'nın her iki ucunda bulunan yaklaşık 20 nükleotidlik kısa bir tekrar dizini (R), viral RNA'nın 5' ucuna özgü bir dizi (U5), viral RNA'nın 3' ucuna özgü bir dizi (U3). Bu dizilerin tekrarları, ters transkriptazın kalıbın uçları arasında iki kez atlamasıyla, DNA sentezi sürecinde oluşur. Sentez, viral RNA'nın 5' ucundaki U5'e komşu primer-bağlanma bölgesine (PBS) bir tRNA primerin bağlanmasıyla başlar. Polimeraz R'yi kopyalar ve RNA-DNA hibridinin RNA ipliği RNaz H tarafından yıkılır. Polimeraz daha sonra RNA kalıbına komplementer tam bir DNA sentezlemek üzere viral RNA'nın 3' ucuna atlar. Kalıbın 5' ucuna bağlı bir primer ile başlatılan ikinci DNA ipliğinin sentezi sırasında polimeraz tekrar atlar. Bu sıçramaların sonucu U3-R-U5 dizilerini içeren LTR'lerin oluşumudur.

Bütün DNA polimerazlarda olduğu gibi, revers transkriptaz da primere gereksinir, retroviruslarda bu, viral RNA'nın 5' ucuna yakın spesifik bir bölgeye (primer-bağlanma bölgesi) bağlanan bir tRNA molekülüdür (Şekil 5.50). DNA sentezi 5'den 3' yönünde ilerlediği için, revers transkriptaz kalıbın ucuna ulaşana kadar, sadece kısa bir DNA parçası sentezlenir. DNA sentezinin devam edebilirliği, revers transkriptaz'ın kalıp RNA molekülünün 3' ucuna "atlayabilme"

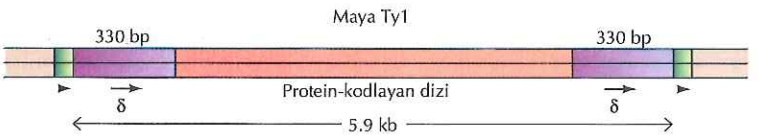
yeteneğine bağlıdır. Bu, revers transkriptaz'ın, DNA-RNA hibridindeki RNA'yı yıkan RNaz H aktivitesi ile başarılır. Sonuç olarak, yeni sentezlenen DNA, viral RNA'nın 5' ve 3' uçlarında bulunan kısa tekrar dizilerine hibridize olabilecek biçimde tek iplikli hale çevrilir. Daha sonra DNA sentezi, viral RNA'ya tamamlayıcı tek iplik DNA üretmek üzere devam eder. DNA'nın karşı ipliğinin sentezi primer olarak davranan bir viral RNA parçası ile kalıp DNA ipliğinin 3'ucuna yakın bir yerden başlar. Sonuç yine, başlangıçta ters transkripsiyon için primer olarak kullanılan tRNA'dan kopyalanan bir primer-bağlanma kısmına sahip kısa bir DNA parçasıdır. tRNA'nın primer bağlanma dizisi, kalıbın diğer ucundaki tamamlayıcı diziyle eşleşmek için "atlayan", yapışkan uçlu bir DNA oluşturmak üzere RNaz H tarafından yıkılır. Ardından DNA sentezi bir kez daha devam ederek, her iki ucunda LTR içeren doğrusal bir DNA ürünü elde edilir.

Doğrusal viral DNA konak hücre kromozomuna, yer değiştiren DNA elemanlarının entegrasyonuna benzer bir süreçle katılır. Katılım viral integraz ile katalizlenir ve hücresel DNA'da birçok farklı hedef dizide meydana gelir. İntegraz viral DNA'nın uçlarından iki bazı keser ve hücresel DNA'da hedef bölgede asimetrik uçlar oluşturur. Hücresel DNA'nın yapışkan uçları viral DNA'nın uçlarına bağlanır ve boşluk DNA sentezi ile doldurulur. Entegre olan provirus böylece, DNA transpozonları sınırlandıran tekrarlara benzeyen, düz tekrarlayan hücre dizileri ile sınırlandırılır.

Viral yaşam döngüsü entegre provirusun, viral proteinleri (integraz ve revers transkriptaz gibi..) sentezini yönlendiren mRNAları ve viral genomik RNA'yı oluşturan transkripsiyonu ile devam eder. Genomik RNA konak hücreden salınacak viral partikülleri içerisine paketlenir. Yeni oluşan viruslar bir başka hücreyi enfekte ederek, DNA sentezini ve entegrasyonu başlatabilirler. Net etki, provirusun bir RNA aracısının sentezi ve ters transkripsiyonu sayesinde bir kromozomal bölgeden diğerine hareketi şeklinde gözlenir.

Diğer retrotranspozonlar, enfeksiyöz partiküller içerisine paketlenmemeleri ve bir hücreden diğerine yayılmayışları ile retroviruslardan farklıdırlar. Bununla beraber, bu retrotranspozonlar aynı hücre içerisinde yeni kromozom bölgelerine, retrovirus replikasyonuna benzer bir mekanizma ile hareket edebilirler.

Bazı retrotranspozonlar (retrovirus-benzeri elemanlar veya LTR retrotranspozonlar olarak adlandırılırlar) yapısal olarak retroviruslara benzerler (Şekil 5.51). Bu tip retrotranspozonlar insan genomunun yaklaşık %8'ini oluşturur. Her iki uçta da LTR dizilerine sahiptirler; revers transkriptaz ve integraz enzimlerini kodlarlar; RNA'ya



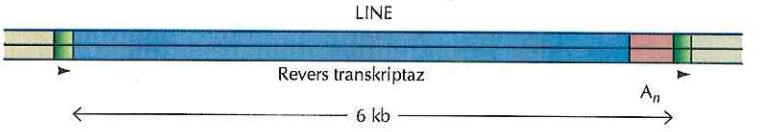
Şekil 5.51 LTR retrotranspozon yapısı
Maya Ty1 yer değiştirebilen elemanı bir retrovirus ile benzer organizasyon gösterir. Revers transkriptaz ve integraz gibi proteinleri kodlayan diziler, yaklaşık 330 baz çiftlik (bp) LTR'lerle (d elamanları olarak adlandırılır) sınırlanmıştır. Entegre olmuş transpozonlar hedef bölge DNA'sının kısa düz tekrarları ile kuşatılmıştır.

transkripsiyon, revers transkriptaz ile yeni DNA kopyasının sentezi ve hücresel DNA'ya entegrasyon yoluyla yer değiştirirler (retroviruslar gibi).

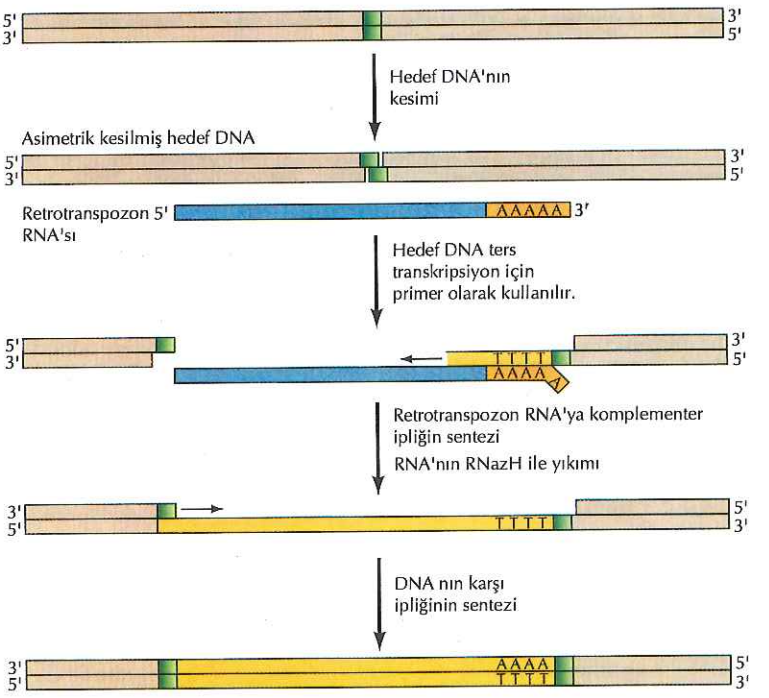
LTR içermeyen retrotranspozonlar, kendi revers transkriptaz'larını kodlamalarına rağmen LTR dizisi barındırmadıkları için retroviruslardan ayrılırlar. Memelilerde bu retrotranspozonların en büyük grubunu, genomda 850,000 kez tekrarlayan ve genomik DNA'nın yaklaşık %21'ini oluşturan yüksek tekrarlı, uzun serpiştirilmiş elemanlar (**LINE**'ler) oluşturur (bkz. Bölüm 4). Her ne kadar bir çok aile üyesi 5' uçlarından kısaltılmış ise de, LINE'lerin tam uzunluğu 6 ila 7 kb kadardır (Şekil 5.52). LINE'lerin 3' uçlarında, mRNA'ya transkripsiyonu sonrasında eklenen poli A kuyruğunun ters transkripsiyonundan kaynaklandığı düşünülen, A-zengin diziler bulunur (bkz. Bölüm 6). Diğer yer değiştiren elemanlar gibi LINE'ler de, entegrasyonları için yapışkan uçlar ve onarım sentezi gerektiğinin kanıtı olarak, hedef bölge DNA'sının kısa düz tekrarlarıyla sınırlandırılmışlardır.

LINE'lerin, LTR dizileri içermemesi nedeniyle, ters transkripsiyon ve daha sonrasında kromozomal DNA'ya entegrasyon mekanizmaları, retroviruslarınkinden ve LTR içeren retrotranspozonlardan faklı olmak zorundadır. Örnek olarak, ters transkripsiyonda, retrotranspozonda kodlanan nükleaz tarafından kesilen entegrasyon hedef bölgesinde ortaya çıkan kromozomal DNA ucu primer görevi yapar (Şekil 5.53). Ters transkripsiyon daha sonra, transpozon RNA'sının 3' ucunda poli A içerisinde başlar ve molekül boyunca devam eder. DNA'nın karşı ipliği, hedef bölge DNA'sının diğer kırık ucunun primer olarak kullanılmasıyla sentezlenir ve retrotranspozon DNA'sının eş zamanlı sentezi ve entegrasyonu gerçekleştirilir.

Kendi revers transkriptazlarını sentezleyemeyen diğer bazı dizi elemanları da RNA aracılığıyla yer değiştirirler. Genomda, yaklaşık 1.5 milyon kopyası bulunan yüksek tekrarlı, serpiştirilmiş kısa elemanlar (**SINE**'ler) bunlara dahildir (bkz. Bölüm 4). İnsanda bu elemanların en önemli grubunu 300 baz uzunluktaki *Alu* dizileri oluşturur. Bu diziler, LTR içermeyen retrotranspozonlara (LINE'ler gibi) benzer şekilde, 3' uçlarında A-zengin bölgeler barındırırlar ve hedef bölge DNA dizilerinin kısa duplikasyonları ile sınırlandırılmışlardır. SINE'ler; protein taşınmasında görevli küçük sitoplazmik RNA'lar ve tRNA'lar gibi küçük RNA'ların ters transkripsiyonu ile oluşmuşlardır. SINE'ler artık işlevsel RNA ürün vermediklerinden, RNA aracılı yer değiştirmelerle oluşmuş psödogenleri (yalancı genler) temsil ederler. Birçok protein kodlayan genin psödogenleri (**işlenmiş psödogenler** olarak adlandırılırlar) de,



Şekil 5.52 İnsan LINE'lerinin yapısı
LINE'ler LTR içermez fakat revers transkriptaz kodlarlar. 3' uçlarında, mRNA'nın 3' ucuna eklenmiş poli-A kuyruğunun ters transkripsiyonu ile oluştuğu düşünülen, A-zengin dizi (A_n olarak simgelenen) bölgelerine sahiptiler. Yer değiştirebilen diğer elemanlar gibi LINE'ler de hedef bölge DNA'sının kısa düz tekrarları ile kuşatılmışlardır.

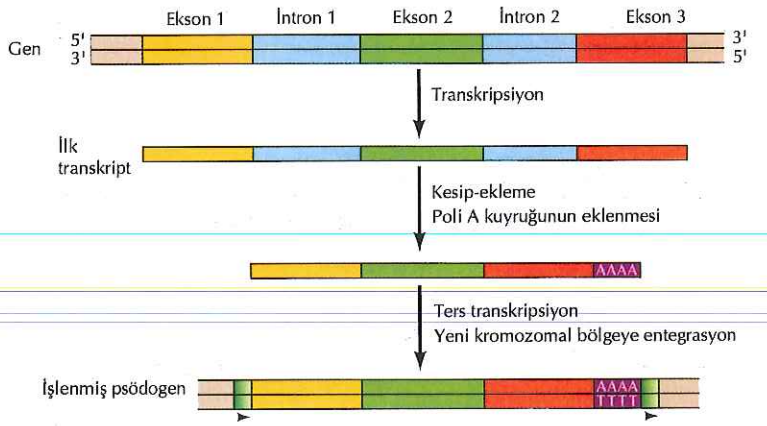


Şekil 5.53 LINE'lerin entegrasyon ve ters transkripsiyon modeli
Hedef bölge DNA'sı retrotranspozonca kodlanan nükleaz ile kesilir. Ters transkripsiyonda hedef DNA'nın kesik ucu primer olarak kullanılır ve retrotranspozon RNA'sının 3' ucunda yer alan poli A kuyruğu içerisinden başlar. Retrotranspozon DNA'nın karşı ipliğinin sentezi benzer şekilde, hedef bölge DNA'sının diğer ipliğinin primer rolüyle başlar.

benzer şekilde, mRNA'ların ters transkripsiyonuyla oluşmuşlardır (Şekil 5.54). İşlenmiş psödogenler, yalnızca bir A-zengin bölgeyle sonlanmalarından değil, ayrıca benzeşen normal genlerde bulunan intronların mRNA işlenmesi sırasında uzaklaştırılmasıyla da kolayca ayırt edilirler. SINE'lerin ve diğer işlenmiş psödogenlerin yer değiştirmesinin, LINE'lerin yer değiştirmesine benzer şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu elemanlar revers transkriptaz ve nükleaz için gen barındırmadıklarından, bunların transpozisyonu olasılıkla genomun bir başka yerinde -muhtemelen LINE'ler gibi diğer retrotranspozonlar tarafından- kodlanan nükleaz ve revers transkriptaz etkinliğini gerektirir.

Yüksek tekrarlı LINE'ler ve SINE'ler her ne kadar genomik DNA'nın önemli bir bölümünü oluşturuyorlarsa da, genomda rasgele bölgelere yer değiştirmeleri içinde bulundukları hücre için yararlı değildir. Bu transpozonlar yeni bir hedef bölgeye entegre olduklarında mutasyon indüklerler ve diğer mutasyon indükleyen ajanlarda olduğu gibi, transpozon katılımı ile oluşan mutasyonların çoğunun hücre için zararlı olması beklenir. Gerçekten de, LINE ve SINE'lerin her ikisinin de transpozisyonları ile oluşan mutasyonlar, bazı hemofili, kas distrofisi, meme kanseri ve kolon kanseri olgularıyla ilişkilendirilmiştir. Diğer taraftan, yer değiştirebilen elemanların hareketleri ile oluşan bazı mutasyonlar, türlerin evrimine olumlu katkıda bulunarak yararlı olabilirler. Örneğin memeli genomlarındaki bazı retrotranspozonların, bitişik genlerin ekspresyonlarını kontrol eden düzenleyici dizileri içerdikleri bulunmuştur.

Mutajen rollerine ek olarak retrotranspozonlar, DNA yeniden düzenlenmelerini uyararak genomun şekillenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin, kromozomal DNA'nın yeniden düzenlenmesi, genomda değişik bölgelerde yerleşik LINE'ler arasında rekombinasyon sonucunda gerçekleşiyor olabilir. Hatta, LINE'lere



Şekil 5.54 İşlenmiş bir psödogen oluşumu
Simgelenen gen, iki intron ile ayrılan üç ekson içermekte. İlk transkriptten intronlar kesip-ekleme yoluyla uzaklaştırılır ve poli A kuyruğu mRNA'nın 3' ucuna eklenir. Ters transkripsiyon ve entegrasyon ile, intronları olmayan ve 3' ucunda A-zengin bölge barındıran işlenmiş psödogen elde edilir. İşlenmiş psödogen, hedef bölge DNA'sının, entegrasyon sürecinde oluşan kısa tekrarları ile sınırlanmıştır.

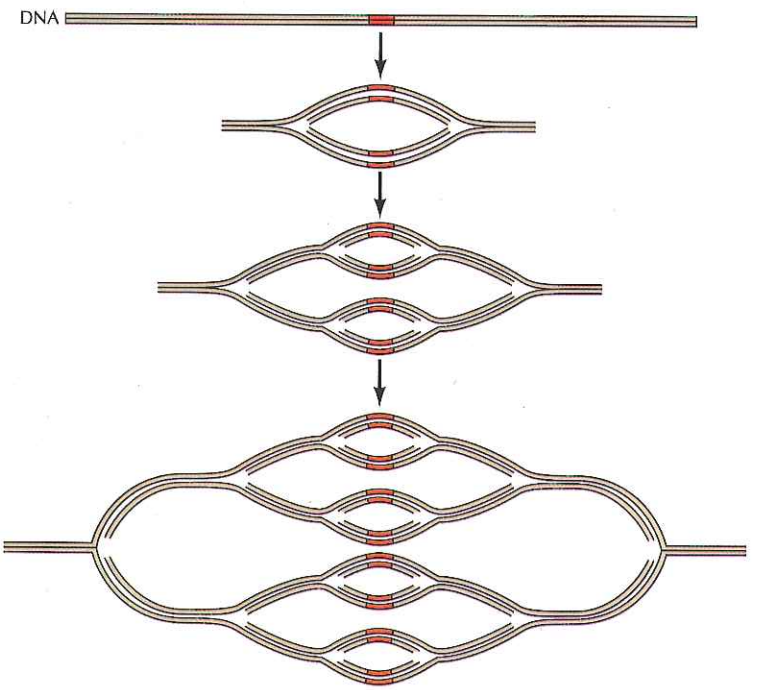
bitişik hücresel DNA dizileri, yer değiştirme sırasında sıklıkla, birlikte taşınırlar. Sonuç olarak, LINE'lerin yer değiştirmesi, hücresel DNA dizilerinin yeni genomik bölgelere hareketine neden olur. LINE'ler aktif genlerin içerisine entegre olabilecekleri için, hücresel DNA dizilerinin birlikte taşınması, yeni kodlayıcı ve/veya düzenleyici dizi kombinasyonlarının oluşumuna yol açarak, yeni genlerin evrimine doğrudan katkıda bulunabilirler.

İnsan genomundaki yer değiştirebilen elemanların büyük çoğunluğu aktif değildir, sadece LINE'lerin 100 kadar kopyası hala, yer değiştirmek için gerekli protein-kodlayan dizilere sahiptir. İnsan DNA transpozonlarının tamamı ve birçok retrotranspozon geçerli işlevsel eleman olmayıp, evrim kalıntılarını simgeler. Ancak bu durum, *Arabidopsis*, *C.elegans*, *Drosophila* ve fare gibi, süregelen çok daha yüksek transpozon aktivitesine sahip diğer türler için geçerli değildir. Örneğin farede, LTR retrotranspozonları, LINE'ler ve SINE'lerin hepsi aktiftir. Sonuç olarak, faredeki tüm mutasyonların yaklaşık %10'unun transpozonlardan kaynaklanmasına karşın bu değer insanda yalnızca 600 mutasyonda 1 civarındadır. İnsan ve fare arasında transpozon aktivitesi açısından, açıklanmayı bekleyen, dramatik ve ilgi çekici bir fark vardır.

Gen Amplifikasyonu

Şu ana kadar tartışılmış olan DNA yeniden düzenlenmeleri genomda bir DNA dizisinin konumunu değiştiriyordu. Hücre içerisinde bir genin kopya sayısını artıran **gen amplifikasyonu**, genom yapısındaki farklı tipte bir değişim olarak değerlendirilebilir. Gen amplifikasyonları, belirli bir bölgenin çok sayıda kopyasını üreten, tekrarlayan DNA replikasyon döngülerinin sonucudur (Şekil 5.55). Amplifiye olmuş DNA dizileri, kromozom dışı serbest moleküller olarak bulunabildikleri gibi, bir kromozom içerisinde ardışık sıralı dizinler olarak da bulunabilirler. Her iki durumda da, transkripsiyon için genin çok sayıda kopyası bulunduğundan, sonuç olarak, amplifiye olan genin ekspresyonu artar.

Gen amplifikasyonu bazen, gelişim için programlanmış gen ekspresyon artışından sorumludur. Prototip örnek, amfibi oositlerinde (yumurtalar) ribozomal RNA genlerinin amplifikasyonudur. Yumurtalar oldukça büyük hücrelerdir ve buna uygun olarak yüksek oranda protein sentezi gereksinimleri vardır. Özellikle amfibi oositleri hacim olarak, tipik bir somatik hücreden yaklaşık bir milyon kez daha büyüktür ve erken gelişim sürecinde büyük miktarlarda proteinin



Şekil 5.55 DNA amplifikasyonu
Tekrarlayan DNA replikasyon turları belirli kromozom bölgelerinin çok sayıda kopyasını oluşturur.

sentezini sağlamak zorundadırlar. Bunun için, ribozomal RNA sentezinin artması gerekir ki, bu da kısmen ribozomal RNA genlerinin amplifikasyonu ile sağlanır. Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, halihazırda her genomda yaklaşık birkaç yüz ribozomal RNA gen kopyası bulunur, ki böylece, somatik hücrelerin gereksinimlerini karşılayacak kadar yeterli ribozomal RNA üretilebilir. Amfibi yumurtalarında bu genler, her oositte yaklaşık bir milyon kopya olacak şekilde, 2000-kez daha amplifiye olur. Bir diğer programlanmış gen amplifikasyonu *Drosophila*'da görülür. Burada, yumurta kabuğunun proteinlerini kodlayan genler (koriyon genleri), yumurta hücrelerinde bu proteine yüksek miktarda gereksinimi karşılamak üzere amplifiye olurlar. Diğer programlanmış gen yeniden düzenlenmeleri gibi gen amplifikasyonu da, sadece ileri derecede özelleşmiş hücrelerde nadir olarak gerçekleşen bir olaydır; gen yeniden düzenlenmesinin genel bir mekanizması değildir.

Gen amplifikasyonları, kanser hücrelerinde anormal bir olay olarak da meydana gelir ve kontrolsüz hücre çoğalmasıyla sonuçlanan artmış gen ekspresyonlarına neden olur. Bu gibi gen amplifikasyonları ilk kez, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan methotrexate'a karşı direnç geliştiren kanser hücrelerinde tanımlanmıştır. Methotrexate, dTTP sentezi için ve dolayısıyla DNA sentezi için gerekli dihidrofolat redüktaz enzimini baskılar. Methotrexate direnci genellikle, dihidroksifolat redüktaz geninin amplifikasyonu ile gerçekleşir ve enzimin üretimi artarak methotrexate'ın inhibisyon etkisi yok edilir. Ayrıca, kanser hücrelerinde gen amplifikasyonu, hücreleri çoğalmaya sürükleyen genlerin (onkogen) ekspresyonlarının artmasına neden olarak, doğrudan tümör gelişimine yol açar (bkz. Bölüm 15). Örneğin *erb*B-2 onkogeninin amplifikasyonu insan meme kanserinde sıkça görülür. Böylelikle, diğer tip DNA yeniden düzenlenmelerinde olduğu gibi, gen amplifikasyonu da, yer aldığı hücre veya organizma için yararlı ya da zararlı etkilere sahipti.

ÖZET

DNA REPLİKASYONU

DNA Polimerazlar: Prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de değişik DNA polimerazlar DNA replikasyonu ve tamirinde belirgin roller üstlenirler. Bilinen bütün DNA polimerazlar önceden sentezlenmiş primer ipliğine dNTP'leri yalnızca 5' den 3' yönünde ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirirler.

Replikasyon Çatalı: DNA'nın atasal iplikleri ayrılır ve replikasyon çatalında iki yeni ipliğin sentezi için kalıp olurlar. Bir yeni DNA ipliği (öncü iplik) sürekli biçimde sentezlenir, diğer iplik (aksak iplik) replikasyonun genel yönlenimine ters olarak sentezlenen küçük DNA fragmanlarının birleşmesiyle oluşur. DNA polimerazlar ve diğer birçok protein DNA'nın aksak ve öncü ipliklerinin sentezinde birlikte hareket ederler.

Replikasyonun Doğruluğu: DNA polimerazlar eklenecek doğru bazı seçerek ve sentezlenen iplikte yanlışını düzeltme özellikleriyle, yanlış eşleşmiş bazları uzaklaştırarak replikasyonun doğruluğunu artırırlar.

Başlangıç Noktaları (orijin) ve Replikasyonun Başlaması: DNA replikasyonu, süreci başlatacak proteinler için bağlanma bölgelerini içeren, spesifik replikasyon orijinlerinden başlar.

Telomerler ve Telomeraz: Kromozom Uçlarının Replikasyonu: Kromozomların uçlarındaki telomerik tekrar dizileri, kendi kalıp RNA'sını taşıyan bir revers transkriptaz (telomeraz) tarafından sentezlenir.

DNA ONARIMI

DNA Hasarının Doğrudan Geri Döndürülmesi: Pirimidin dimerleri ve alkillenmiş guanin gibi bazı genel DNA hasar tipleri, hasarın doğrudan geri döndürülmesi ile onarılır.

Kesip-Çıkararak Onarım: Bir çok DNA hasar çeşidi, hasarlı DNA'nın kesilip çıkarılmasıyla onarılır. Oluşan boşluk, hasar içermeyen tamamlayıcı ipliğin kalıp olarak kullanılmasıyla sentezlenen yeni DNA ile kapatılır. Baz çıkarma onarımında, tek hasarlı özel bazlar DNA molekülünden çıkarılır. Bunun aksine nükleotid çıkarma onarım sistemleri DNA yapısını bozan çok çeşitli lezyonlar tanınır ve hasarlı bazlar bir oligonükleotidin parçası olarak uzaklaştırılır. Üçüncü tip kesip-çıkararak onarma sistemi yeni sentezlenmiş DNA'dan yanlış eşleşmiş bazları spesifik olarak çıkarır.

Hata Eğilimli Onarım: Özelleşmiş bazı DNA polimerazlar DNA'nın hasarlı olduğu bölgeden DNA'yı replike edebilirler, ancak, polimerazların bu özelliği yüksek oranda yanlış bazın eklenmesine neden olabilir.

Rekombinasyonel Onarım: Hasarlı DNA bölgesi hasarlı olmayan molekül ile, rekombinasyon yoluyla yer değiştirebilir. Bu mekanizma DNA replikasyonu sürecinde karşılaşılan hasarların ve çift iplik kırıklarının onarımında önemli rol oynar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

DNA polimeraz, mutajen

replikasyon çatalı, Okazaki fragmanları, DNA ligaz, öncü iplik, aksak iplik, primaz, RNaz H, eksonükleaz, helikaz, tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler, topoizomerazlar

yanlışını düzeltme (proofreading)

replikasyon orijini, bağımsız replike olabilen diziler (ARS), orijin replikasyon kompleksi (ORC)

telomer, telomeraz, revers transkriptaz

pirimidin dimeri, fotoreaktivasyon

baz-çıkarma onarımı, DNA glikozilaz, AP endonükleaz, nükleotid kesip-çıkarma onarımı, eksinükleaz, transkripsiyon-eşlikli onarım, yanlış-eşleşme onarımı

hata-eğilimli onarım

rekombinasyonel onarım

HOMOLOG DNA DİZİLERİ ARASINDA REKOMBİNASYON

DNA Molekülleri Kırılma ve Yeniden Birleşme Yoluyla Bir Araya Gelir: Rekombinasyonun moleküler mekanizması, atasal DNA moleküllerinin kırılıp yeniden birleşmesini gerektirir.

genel homolog rekombinasyon, Holliday modeli, Holliday kavşağı

Homolog Rekombinasyon Modelleri: Homolog DNA moleküllerinin birbirine yanaşması baz eşleşmesi ile sağlanır. Atasal DNA'nın kırık ipliklerinin diğer atasal moleküle eklenmesiyle Holliday kavşağı olarak bilinen çaprazlanmış iplik ara ürününü oluştgurur. Rekombinant moleküller daha sonra çaprazlanmış ipliklerin kesilip yeniden birleşmesiyle oluşur.

RecA

Homolog Rekombinasyonda Görevli Enzimler: Homolog rekombinasyonun temel enzimi, homolog DNA'lar arasında ipliklerin değişimini katalizleyen RecA'dır. Diğer enzimler atasal DNA'ları kesip açarak Holliday kavşağını çözerler.

DNA YENİDEN DÜZENLENMELERİ

bölgeye-özgül rekombinasyon, lizojeni, antijen, immünglobulin, T hücre reseptörü

Bölgeye-Özgül Rekombinasyon: Bölgeye-özgül rekombinasyon, süreci düzenleyen proteinler tarafından tanınan özgül DNA dizileri arasında meydana gelir. Omurgalılarda bölgeye özgül rekombinasyon, bağışıklık sisteminin gelişimi sırasında, T hücre reseptörü ile immünglobulin genlerinin oluşumunda kritik bir rol oynar.

transpozisyon, yer değiştirebilen eleman, transpozon

DNA Aracılar ile Transpozisyon: DNA transpozonların çoğu, eklenme bölgelerinde özel DNA dizilerine gereksinim duymadan, genom boyunca hareket ederler. Maya ve protozoalarda ise, bazı DNA dizilerinin özgül hedef dizilere transpozisyonu, gen ekspresyonlarını düzenleyen, programlanmış yeniden düzenlenmelere yol açar.

retrotranspozon, retrovirus, revers transkriptaz, uzun uç tekrarları (LTR), LINE, SINE, işlenmiş psödogen

RNA Aracılar ile Transpozisyon: Ökaryot hücrelerdeki bir çok transpozon, retrovirusların replikasyonuna benzer biçimde, RNA aracılarının ters transkripsiyonu ile yer değiştirirler. Bu retrotranspozonlar, memeli genomlarının yüksek tekrarlı LINE ve SINE dizilerini kapsar.

gen amplifikasyonu

Gen Amplifikasyonu: Gen amplifikasyonları bir kromozomal bölgenin tekrarlayan replikasyonunun sonucudur. Bazen, gen Amplifikasyonu, gelişim sürecinde artmış gen ekspresyon mekanizma oluşturur. Gen amplifikasyonları, kanser hücrelerinde sıklıkla görülür ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan artmış gen ekspresyonlarıyla kendini gösterir.

Sorular

1. *E.coli*'nin farklı DNA polimerazlarının rollerini tartışınız.

2. Okazaki fragmanı nedir? Kesintisiz bir ipliği nasıl oluştururlar?

3. Topoizomeraz I ve II'nin etkinliklerini kıyaslayınız.

4. Maya hücresinde bir DNA dizininin, bir replikasyon orijini mi yoksa kendi başına replike olan bir dizi (ARS) mi içerdiğini nasıl test edersiniz?

5. İnsan genomu binlerce replikasyon orijinine sahipken, *E.coli* genomu neden tek bir tane içerir?

6. Bir replikasyon orijininde DNA sentezi nasıl başlar?

7. Telomeraz, DNA polimerazların kromozom uçlarında DNA replikasyonunu tamamlayamamasını telafi etmek üzere, kromozom uçlarını nasıl uzatır?

8. Nükleotid kesip çıkarma onarımını açıklayınız.

9. Hücre, DNA'sındaki çift iplik kırığını nasıl onarır?

10. Meme kanserinin DNA onarım mekanizmasıyla ilişkisi nedir?

11. Xeroderma pigmentosum'lu hastalar son derece yüksek deri kanseri olasılığı göstermelerine karşın aynı derecede yüksek iç organ (örn., kolon kanseri) kanser riski taşımazlar. Bu durum, iç organ kanserlerine neden olan DNA hasarlarının çeşidi konusunda nasıl bir öngörü sağlar?

12. Lenfositlerde bölgeye-özgül rekombinasyon için gerekli bir genden yoksun olan mutant bir farenin fenotipinin nasıl olmasını beklersiniz?

13. AIDS tedavisi amacıyla klinikte kullanılmakta olan ve deneme aşamasındaki ilaçların büyük bölümü HIV revers transkriptazı inhibitörüdür. İnsan hücrelerinde hangi revers transkriptazlar da bu ilaçlar tarafından inhibe edilecektir? Bu enzimlerin baskılanmasının sonuçları nelerdir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

DNA Replikasyonu

Baker, T. A. and S. P. Bell. 1998. Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell* 92:296-305. [R]

Bell, S. P. 2002. The origin replication complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.* 16: 659-672. [R]

Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 333-374. [R]

Benkovic, S. J., A. M. Valentine and F. Salinas. 2001. Replisome-mediated DNA replication. *Ann. Rev.* Biochem. 70:181-208. [R]

Blackburn, E. H. 1992. Telomerases. Ann. Rev. *Biochem.* 61:113-129. [R]

Cairns, J. 1963. The chromosome of *Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:43-46. [P]

Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* 70:369-413. [R]

Ellison, V. and B. Stiliman. 2001. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* 106: 655-660. [R]

Frick, D. N. and C. C. Richardson. 2001. DNA primases. *Ann. Rev. Biochem.* 70:39-80. [R]

Gilbert, D. M. 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294:96-100. [R]

Goodman, M. F. 1997. Hydrogen bonding re-visited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10493-10495. [R]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327-341. [P]

Hubscher, U., G. Mağa and S. Spadari. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 71:133-163. [R]

Kornberg, A., I. R. Lehman, M. J. Bessman and E. S. Simms. 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 21:197-198. [P]

Kunkel, T. A. and K. Bebenek. 2000. DNA replication fidelitv. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 497-529. [R]

Lohman, T. M. and K. P. Bjornson. 1996. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA un-winding. *Ann. Rev. Biochem.* 65:169-214. [R]

McEachern, M. J., A Krauskopf and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. *Ann. Rev. Genet.* 34: 331-358. [R]

Ogawa, T. and T. Okazaki. 1980. Discontinuous DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 421-457. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhi and R. W. Davis. 1979. isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-43. [P]

Waga, S. and B. Stillman. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro. Nature* 369:2.07-212. [P]

Waga, S. and B. Stillman. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 721-751. [R]

West, S. C. 1996. DNA helicases: New breeds of translocating motors and molecular pumps. *Cell* 86:177-180. [R]

Wold, M. S. 1997. Replication protein A: Aheterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 61-92. [R]

Zakian, V. A. 1995. Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270:1601-1607. [R]

DNA Onarımı

Batty, D. P. and R. D. Wood. 2000. Damage recognition in nudeotide excision repair of DNA. *Gene* 241:193-204. [R]

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218:652-656. [P]

Cox, M. M. 2001. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli:* questions. *Ann. Rev. Genet.* 35: 53-82. [R]

De Laat, W. L., N. G. J. Jaspers and J. H. J. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nudeotide excision repair. *Genes Dev.* 13: 768-785. [R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027-1038. [P]

Friedberg, E. C., R. VVagner and M. Radman. 2002. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* 296: 1627-1630. [R]

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. 1995. DNA *Repair and Mutagenesis.* Washington, D.C: ASM Press.

Goodman, M. F. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 71:17-50. [R]

Harfe, B. D. and S. Jinks-Robertson. 2000. DNA mismatch repair and genetic instability. *Ann. Rev. Genet.* 34: 359-399. [R]

Hoeijmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374. [R]

Khanna, K. K. and S. P. Jackson. 2001. DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27: 247-254. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75:1215-1225. [P]

Livneh, Z. 2001. DNA damage control by novel DNA polymerases: translesion replication and mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276: 25639-25642. [R]

Modrich, P. 1997. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 24727-24730. [R]

Sancar, A. 1996. DNA excision repair. *Ann. Rev. Biochem.* 65:43-81. [R]

Seeberg, E., L. Eide and M. Bjoras. 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 20: 391-397. [R]

Svejstrup, J. Q. 2002. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 21-29. [R]

Wood, R. D. 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 23465-23468 [R]

Homolog DNA Dizileri Arasında Rekombinasyon

Baumann, P. and S. C. West. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.* 23: 247-251. [R]

DasGupta, C., A. M. Wu, R. Kahn, R. P. Cunningham and C. M. Radding. 1981. Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by *E. coli* RecA protein. *Cell* 25:507-516. [P]

Haber, J. E. and W.-D. Heyer. 2001. The fuss about Mus81. *Cell* 107: 551-554. [R]

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282-304. [P]

Kowalczykowski, S. C. and A. K. Eggleston. 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 991-1043. [R]

Meselson, M. and J. J. Weigle. 1961. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 857-868. [P]

Potter, H. and D. Dressler. 1976. On the mechanism of genetic recombination: Electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3000-3004. [P]

Radding, C. M. 1991. Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein. *J. Biol. Chem.* 266: 5355-5358. [R]

Shinohara, A. and T. Ogawa. 1995. Homologous recombination and the roles of double strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20: 387-391.[R]

Smith, G. R. 2001. Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Ann. Rev. Genet.* 35: 243-274. [R]

Stahl, F. 1996. Meiotic recombination in yeast: Coronation of the double-strand-break repair model. *Cell* 87:965-968. [R]

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33:25-35. [P]

Taylor, A. F. 1992. Movement and resolution of Hollidav junctions by enzymes from *E. coli*. *Cell* 69: 1063-1065. [R]

West, S. C. 1992. Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 603-640. [R]

West, S. C. 1997. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Ann. Rev. Genet.* 31: 213-244. [R]

DNA Yeniden Düzenlenmesi

Bassing, C. H., W. Swat and F. W. Alt. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109: S45-S55. [R]

Boeke, J. D., D. J. Garfinkel, C. A. Styles and G. R. Fink. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40: 491-500. [P]

Craig, N. L. 1995. Unity in transposition reactions. *Science* 270: 253-254. [R]

Craig, N. L. 1997. Target site selection in transposition. *Ann. Rev. Biochem.* 66:437-474. [R]

Davis, M. M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 475-496. [R]

Fedoroff, N. V. 2000. Transposons and genome evolution in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 97: 7002-7007. [R]

Fedoroff, N. and D. Botstein. 1992. *The Dynamic Genome: Barbara McClintock's Ideas in the Century of Genetics.* Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Finnegan, D. J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5:103-107. [R]

Gilboa, E., S. W. Mitra, S. Goff and D. Baltimore. 1979. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* 18: 93-100. [P]

Haren, L., B. Ton-Hoang and M. Chandler. 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Ann. Rev. Microbiol.* 53: 245-281. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628-3632. [P]

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921. [P]

Kidwell, M. G. and D. Lisch. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7704-7711. [R]

Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58:913-949. [R]

Lewis, S. and M. Gellert. 1989. The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* 59: 585-588. [R]

McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:197-216. [P]

Moran, J. V., R. J. DeBerardinis and H. H. Kazazian Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283: 1530—1534. [P]

Ostertag, E. M. and H. H. Kazazian Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Ann. Rev. Genet.* 35: 501-538. [R]

Stark, G. R., M. Debatisse, t. Giulotto and G. M. Wahl. 1989. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57: 901-908. [R]

Stark, G. R. and G. M. Wahl. 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 447-491. [R]

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581. [R]

Venter, J. C. and 273 others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 13U4-1351. [P]

Weiner, A. M., P. L. Deininger and A. Efstratiadis. 1986. Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 631-661. [R]

Bölüm 6

RNA Sentezi ve İşlenmesi

Prokaryotlarda Transkripsiyon 231

Ökaryot RNA Polimerazları ve Genel Transkripsiyon Faktörleri 239

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi 244

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü 262

ANAHTAR DENEY: Ökaryot Transkripsiyon Faktörlerinin İzolasyonu 251

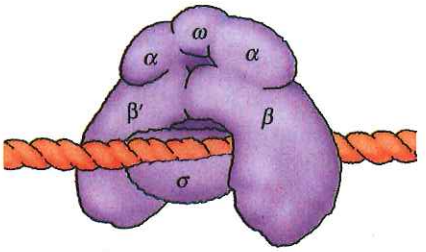
ANAHTAR DENEY: snRNP'lerin Keşfi 268

BÖLÜM 4 VE 5, GENOMİK DNA'NIN, tüm hücresel aktiviteleri yöneten genetik yönergeler serisi olarak değerlendirilebilecek, organizasyonunu ve korunumunu ele aldı. Bu yönergeler, RNA ve proteinlerin sentezi yoluyla uygulanmaktadır. Önemli olan, hücre davranışlarının, sadece hangi genlerin kalıtıldığına göre değil, her hangi bir zamanda bu genlerden hangilerinin ifadelendiğine göre belirlenmesidir. Gen ekspresyonunun düzenlen-mesi, hücrelerin içinde var oldukları çevre koşullarının değişimlerine uyumlarını sağlar ve kompleks bitki ve hayvanların farklılaşmış çeşitli hücre tiplerinin değişik aktivitelerinden sorumludur. Örneğin, kas ve karaciğer hücreleri aynı genleri içerir; hücrelerin işlevleri genomlarındaki farklılıklar ile değil, çoğalma ve farklılaşmayı yönlendiren gen ekspresyon paternleri tarafından düzenlenir.

Gen ekpresyonunun ilk basamağı olan DNA'dan RNA sentezi, prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de gen regülasyonun temel basamağıdır. Ökaryot hücrelerdeki RNA'lar, ilk transkriptten işlevsel formlara dönüştürülmek üzere, daha sonra değişik yollarla- örneğin, intronların kesilip çıkarılmasıyla (kesip-ekleme) - modifiye edilir. RNA'nın değişik tipleri hücrede farklı roller oynar: Mesajcı RNA'lar (mRNA) protein sentezi için kalıptır; ribozomal RNA'lar (rRNA) ve taşıyıcı RNA'lar (tRNA) mRNA'nın proteine çevriminde fonksiyon gösterir. Diğer küçük RNA'ların işlevleri, mRNA kesilip-eklenmesi, rRNA işlemlenmesi ve ökaryotlarda protein gruplandırılmasıdır. Transkripsiyon ve RNA işlemlenmesi bu bölümde tartışılmaktadır. Gen ekspresyonun son basamağı olan mRNA'ların proteine çevrimi (translasyon) Bölüm 7'nin konusudur.

Prokaryotlarda Transkripsiyon

Moleküler biyolojinin pek çok alanında olduğu gibi, *E.coli* çalışmaları, sonradan gelen ökaryot hücrelerdeki transkripsiyon çalışmaları için bir model oldu. Bölüm 3'de gözden geçirildiği gibi, mRNA ilk olarak *E. coli*'de bulunmuştur. *E.coli* aynı zamanda RNA polimerazın saflaştırıldığı ve çalışıldığı ilk organizmadır. Transkripsiyonun regülasyonunu sağlayan temel mekanizmalar da aynı şekilde, besin



Şekil 6.1 *E. coli* RNA polimerazı
Tam enzim, altı alt birimden oluşur: iki α, bir β, bir β', bir ϖ ve bir σ. σ altbirimi, göreli olarak zayıf bağlanır ve çekirdek polimerazı oluşturan diğer beş alt birimden ayrılabilir.

varlığındaki değişiklikler gibi çevre şartları değişimlerine hücrenin uyumunu sağlayan gen ekspresyonu regülasyonu, *E. coli*'de yapılan öncü deneylerle aydınlatılmıştır. E.coli'deki transkripsiyonun anlaşılması, sonuç olarak, ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonunu düzenleyen çok daha karmaşık mekanizmaların çalışılmasına temel sağlamıştır.

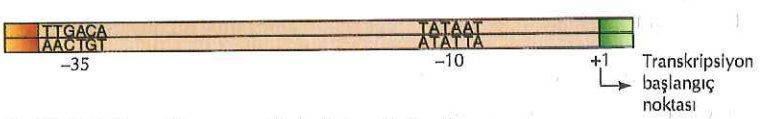
RNA Polimeraz ve Transkripsiyon

RNA sentezinden sorumlu başlıca enzim olan **RNA polimeraz**, DNA kalıbı tarafından yönlendirilmiş olarak, ribonükleozid 5'- trifosfatların (NTP'ler) polimerleşmesini katalizler. RNA sentezi DNA'nınkine benzer ve RNA polimeraz da DNA polimeraz gibi, RNA zincirinin uzamasını daima 5'-3' yönünde katalizler. DNA polimerazdan farklı olarak, RNA polimeraz RNA sentezinin başlaması için bir primere gereksinim duymaz. Transkripsiyon, genlerin başlangıcındaki özgül yerlerde, *de novo* olarak başlar. Başlangıç işlemi, transkripsiyonun regülasyonu için ana basamak olduğundan, özellikle önemlidir.

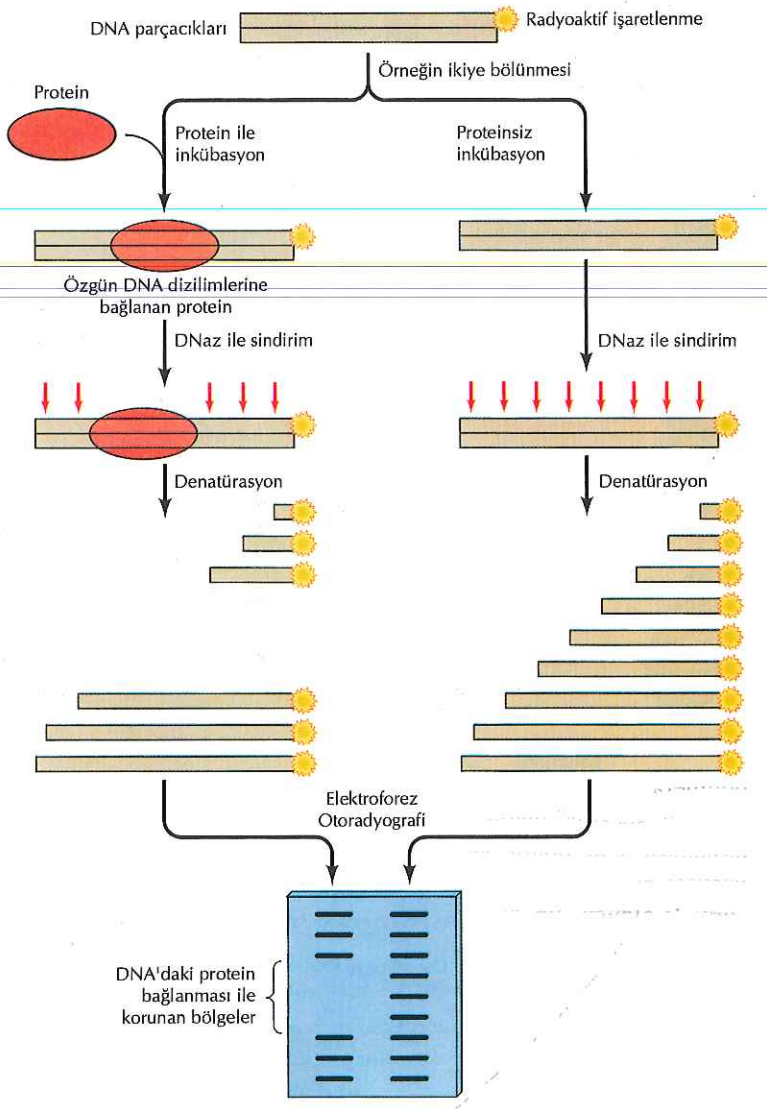
RNA polimeraz, DNA polimeraz gibi, çok sayıda polipeptid zincirinden oluşmuş kompleks bir enzimdir. Tam bir bakteriyel enzim; α, β, β', ω ve σ olarak isimlendirilen beş farklı tip alt birimden oluşur (Şekil 6.1). Sigma alt birimi, göreceli olarak zayıf bağlanır ve diğer alt birimlerden ayrıldığında, iki α, bir β, bir β' ve bir ω alt biriminden oluşan çekirdek polimeraz ortaya çıkar. Çekirdek polimeraz, NTP'lerin RNA'ya polimerleşmesini katalizleyebilir ve enzimin temel katalitik aktivitesi için σ gerekli değildir. Buna rağmen, çekirdek polimeraz, transkripsiyonun normal başlangıç işareti olan DNA dizinine spesifik olarak bağlanamaz; bu yüzden transkripsiyonun başlaması için doğru yerin tanınmasında σ alt birimi gereklidir. İşlevsel bir RNA'nın sentezi, genin başlangıç noktasından başlamak zorunda olduğu için, bu yerin seçimi, transkripsiyonun kritik öğesidir.

RNA polimerazın, genin transkripsiyonunu başlatmak için bağlandığı spesifik DNA dizinine, **promotör** denir. Promotör işlevi gören DNA dizisi, ilk olarak *E.coli*'den izole edilen farklı gen serilerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması ile tanımlanmıştır. Bu karşılaştırmalar; transkripsiyonun başlangıç noktasının yukarı yönündeki bu bölgenin, değişik genlerde benzer olan iki takım dizi içerdiğini ortaya çıkardı. Bu ortak dizilerin her biri, altı nükleotid içermekte ve transkripsiyon başlangıç yerinin yaklaşık olarak 10 ve 35 baz çifti yukarısında bulunmaktadır (Şekil 6.2). Ortak diziler, -10 ve -35 elamanları olarak adlandırılırlar ve konumları, +1 konum olarak tanımlanan göreceli transkripsiyon başlangıç bölgesini belirler. Farklı promotörlerdeki -10 ve -35 konumundaki diziler, aynı değildir, ancak, konsensus (ortak) dizi olarak tanımlanmak için yeteri kadar benzerdirler ve bazlar sıklıkla aynı pozisyonda bulunur.

Çeşitli tipte deneysel kanıtlar, -10 ve -35 promotör elemanlarının fonksiyonel önemini desteklemektedir. Bunlardan ilkine göre,

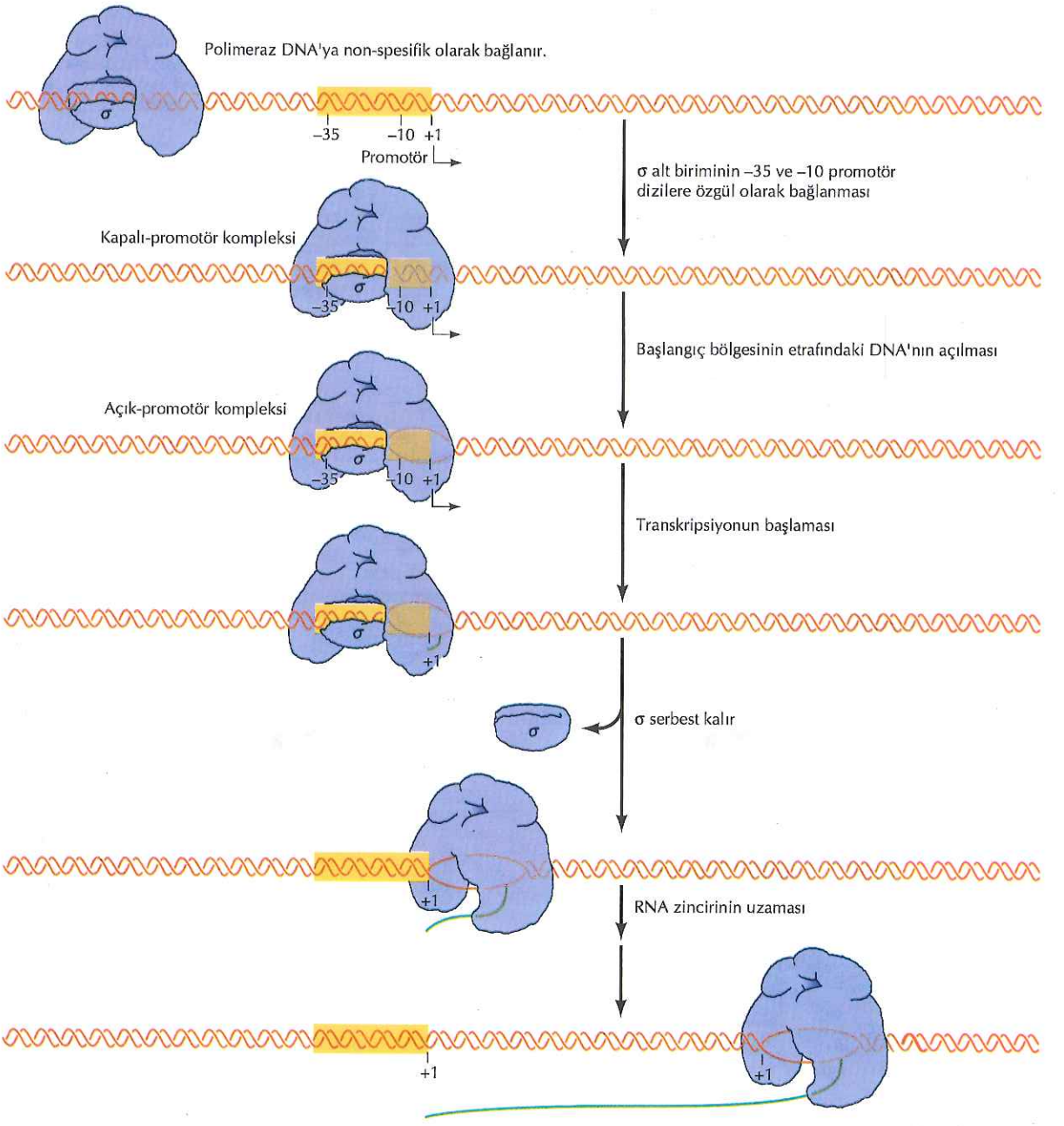


Şekil 6.2 E. coli promotörlerinin dizileri
E. coli promotörleri, transkripsiyon başlama yerinin (+1) 10 ve 35 baz çifti yukarısında yerleşik iki takım dizi ile karakterizedir. Farklı promotörlerde bulunan konsensus diziler, bazlar açısından sıklıkla uyuşum gösterir.



Şekil 6.3 DNA ayak izi çıkarma
Bir ucundan radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA parçacıkları içeren örnek, ikiye bölünür ve örneğin bir yarısı, parçacıklardaki spesifik DNA dizisine bağlanan protein ile inkübe edilir. Sonra örneklerin her ikisi birden, ortalama her molekül için bir kesim ortaya çıkaracak koşullar altında DNaz ile sindirilir. Daha sonra, DNA-protein kompleksi denatüre edilir ve DNaz sindirimi sonucu ortaya çıkan radyoaktif işaretli DNA parçacıklarının büyüklükleri, elektroforez ile incelenir (DNA dizi analizinde olduğu gibi). Proteinin bağlanarak DNaz sindiriminden koruduğu DNA fragmanları, protein ile inkübe edilen DNA örneğinde kaybolur.

konsensus dizileri farklı promotöre sahip genler, promotörleri konsensus dizilerle daha çok benzeyen genlerden daha az verimlilikle transkribe olur. İkincisi, -10 ve -35 konsensus dizilerde ortaya çıkan mutasyonlar, promotör işlevinde güçlü etkilere sahiptir. Üçüncüsü, RNA polimerazın promotöre bağlandığı yerler, DNA'ya bağlanan proteinlerin bağlanma yerlerinin tanımlanmasında geniş çapta kullanılan **ayak-izi-çıkarma (footprinting)** deneyleri ile direkt olarak tanımlanmıştır (Şekil 6.3). Bu tip deneylerde, DNA parçacığı bir ucundan radyoaktif olarak işaretlenir. İşaretli DNA, ilgilenilen protein ile beraber inkübe edilir (örn; RNA polimeraz) ve sonra DNaz ile kısmi sindirime tabi tutulur. Yöntemin temel ilkesi, DNA'nın protein bağlanan bölgesinin DNaz sindiriminden korunmasıdır. Bu bölgeler, protein-bağlı DNA sindirim ürünleri ile, proteinle karşılaştırılmamış paralel DNA örneklerinin, aynı DNaz ile muamele sonuçlarının karşılaştırılmasıyla tanımlanabilir. Bu temel yöntemin DNA'yı belirli nükleotidlerde modifiye eden ve kesen kimyasal ajanların kullanıldığı varyasyonları, protein ile temasta bulunan spesifik DNA bazlarının



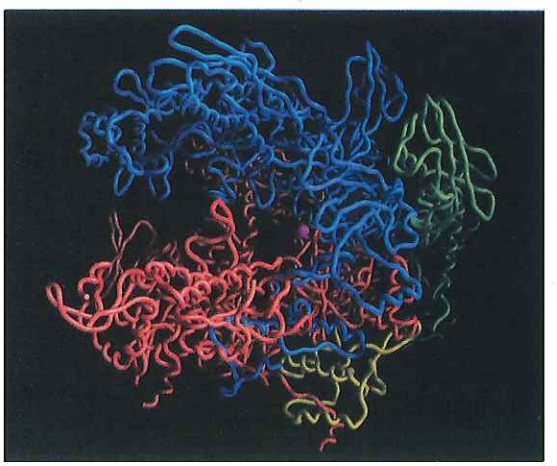
Şekil 6.4 *E. coli* RNA polimerazı ile transkripsiyon
Polimeraz önce, DNA'ya non-spesifik olarak bağlanır, σ altbirimi, -35 ve -10 promotör elemana bağlanıncaya kadar ilerler ve kapalı-promotör kompleksi oluşur. Daha sonra polimeraz, başlangıç yerinin çevresindeki DNA'yı açar ve serbest NTP'lerin polimerleşmesiyle transkripsiyon başlar. Sonra σ altbirimi, çekirdek polimerazdan ayrılır ve çekirdek polimeraz DNA üzerinde ilerleyerek, büyüyen RNA zincirini uzatır.

tanımlanması için kullanılabilir. Bu gibi ayak izi analizleri, RNA polimerazın, promotör üzerinde genellikle, -40 dan +20 ye uzanan (transkripsiyon başlangıç yerinin 40 nükleotid yukarısından 20 nükleotid aşağısına) yaklaşık 60 bazlık bir bölgeye bağlandığını göstermiştir. Sigma alt birimi, -35 ve -10 promotör bölgelerin ikisine de spesifik olarak bağlanır ve bu dizilerin, promotör fonksiyonundaki önemini kanıtlar. *E. coli* promotörleri, -35 bölgenin yukarısında yerleşik olan üçüncü bir diziye sahiptir ve bu, RNA polimeraz α alt birimi için özgül bağlanma yeri işlevi görür.

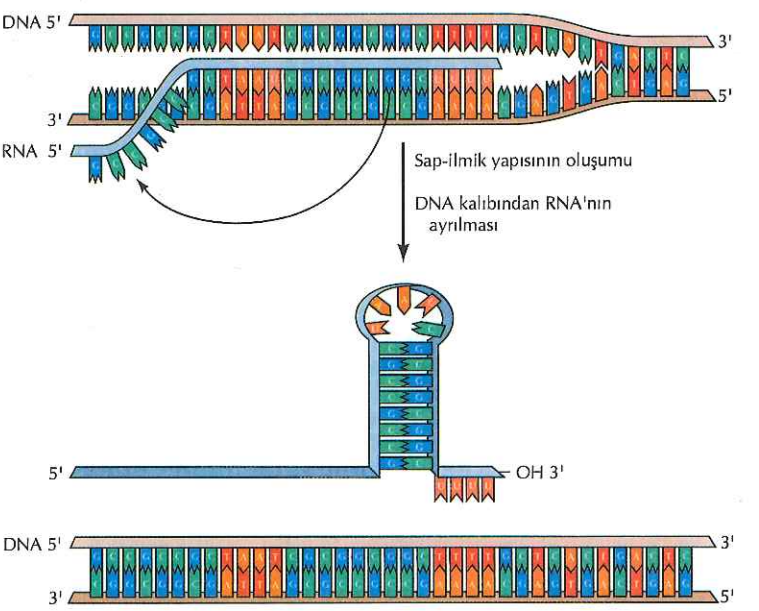
Sigmanın yokluğunda, RNA polimeraz DNA'ya nonspesifik olarak düşük afinite ile bağlanır. Sigmanın rolü, polimerazın promotörlere, -35 ve -10 dizilerin ikisine birden özgül olarak bağlanmasını yönetmek ve transkripsiyonun, genin başlangıcından başlamasına kılavuzluk etmektir (Şekil 6.4). Polimeraz ile promotör arasındaki ilk bağlanmadan, DNA açılmamış olduğu için kapalı-promotör kompleksi olarak söz edilir. Daha sonra polimeraz, -12 den +2 ye olmak üzere DNA'nın 14 bazını açarak, transkripsiyon için tek-iplikli DNA'nın kalıp olmaya uygun olduğu açık-promotör kompleksini oluşturur. Transkripsiyon, iki serbest NTP'nin birleşmesi ile başlar. Yaklaşık ilk 10 nükleotidin eklenmesinden sonra σ, polimerazdan ayrılır, sonrasında polimeraz promotörü bırakır ve büyüyen RNA zincirinin uzamasının devamı için kalıp DNA'da ileri doğru hareket eder.

Uzama sırasında polimeraz, mRNA'yı sentezlerken kalıp ile birleşik kalır. Polimeraz yol alırken, transkripsiyon bölgesinde yaklaşık 15 bazlık bir açık bölge kalacak şekilde, öndeki kalıp DNA'yı açar ve arkadaki DNA'yı geri sarar. Bakteri RNA polimerazının yüksek çözünürlüklü yapısal analizleri, β ve β' alt birimlerinin, DNA kalıbını kavrayan yengeç kıskacı-benzeri bir yapısı olduğunu göstermiştir (Şekil 6.5). β ve β' alt birimler arasındaki iç kanal, DNA'nın yaklaşık 20 baz çiftini barındırır ve polimerazın aktif bölgesini içerir.

RNA sentezi, polimeraz sonlandırma sinyaliyle karşılaşıncaya kadar devam eder, bu noktada transkripsiyon durur, RNA, polimerazdan ayrılır ve enzim DNA kalıbını terk eder. *E. coli*'de bulunan en basit ve en sık rastlanılan tip sonlandırma sinyali, ardından dört veya daha fazla A nükleotidi gelen, GC-zengin bir dizinin simetrik, ters tekrarlarından oluşur (Şekil 6.6). GC-zengin ters tekrarların transkripsiyonu, RNA bölümünün tamamlayıcı baz eşleşmesiyle kalıcı bir sap-ilmik yapısı oluşturmasıyla sonuçlanır. RNA'da bu gibi, kendini-tamamlayan yapıların oluşumu, DNA ile olan ilişkisini bozar ve transkripsiyonu sonlandırır. A ve U arasındaki hidrojen bağları, G ve C arasındakilerden daha zayıf olduğundan, ters tekrarların aşağı tarafındaki A nükleotidlerin varlığının, RNA'nın kalıptan ayrılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de bulunan sonlandırma sinyallerinin diğer tipleri, RNA'da sap-ilmik yapının oluşumundan ziyade, transkripsiyonu özgül DNA dizilerinde sonlandıran proteinlerin bağlanmasına gereksinir.



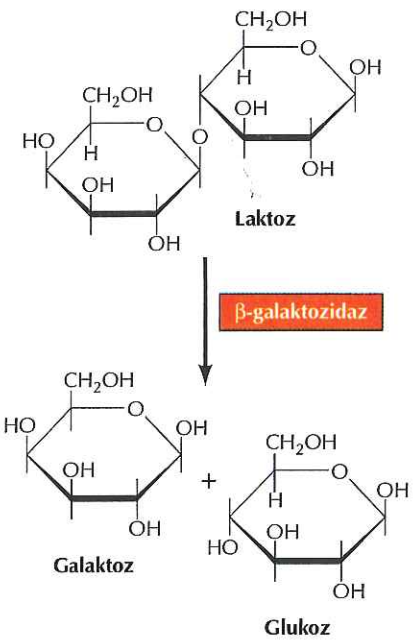
Şekil 6.5 Bakteri RNA polimerazının yapısı
Polimerazın α alt birimleri koyu yeşil ve açık yeşil, β mavi, β' pembe ve ω sarı renklendirilmiştir. (Rockefeller University, Seth Darst'ın katkısı).



Şekil 6.6 Transkripsiyonun sonlanması
Transkripsiyonun sonlanması, dört adenin nükleotidin izlediği GC-zengin ters tekrarlar tarafından belirlenir. Ters tekrar, RNA'da kararlı bir sap-ilmik yapılanma oluşturur ve sonucunda RNA, DNA kalıptan ayrılır.

Represörler ve Transkripsiyonun Negatif Kontrolü

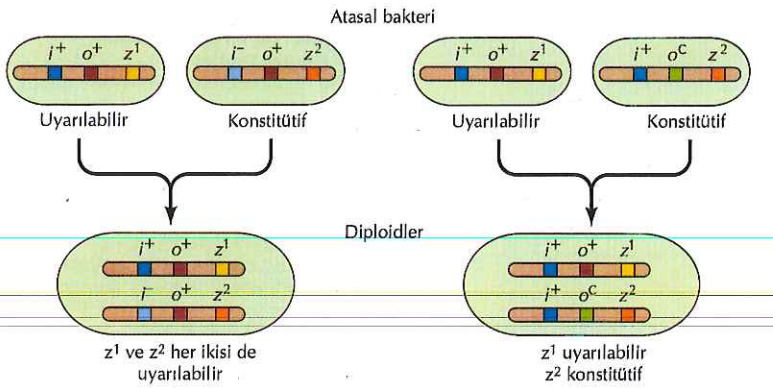
E. coli'de gen regülasyonun öncü çalışmaları, François Jacob ve Jacques Monod tarafından 1950'lerde uygulanmıştır. Bu araştırmacılar ve meslektaşları, glukoz ve galaktoza parçalanması yoluyla enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılabilen laktozun metabolizmasında yer alan enzimlerin ekspresyonunu incelediler (Şekil 6.7). Laktozun yıkımını katalizleyen enzim (β-galaktozidaz) ve laktoz metabolizmasında yer alan diğer enzimler, yalnızca, bakteri tarafından kullanılabilecek laktoz varsa eksprese edilirler. Aksi halde, hücre gereksiz RNA ve protein sentezine enerji harcamaktan kaçınma yeteneğindedir. Böylece laktoz, kendi metabolizmasında yer alan enzimlerin sentezini uyarır. Beta-galaktozidaza ilave olarak, laktoz metabolizması sıkıca bağlı başka iki genin ürünlerini de kapsamaktadır: hücre içine laktoz taşıyan laktoz permeaz ve permeaz tarafından laktozun yanında hücre içine taşınan toksik tiogalaktozidleri inaktive ettiği düşünülen transasetilaz. Jacob ve Monod, tümüyle genetik deneylere dayalı çalışmalarıyla, bu genlerin ekspresyonunun regülasyon mekanizmasını ortaya çıkararak, bugünkü transkripsiyon kontrolü anlayışımızın temeli olan bir model oluşturdular.



Şekil 6.7 Laktoz metabolizması
β-galaktozidaz laktozun glukoz ve galaktoza hidrolizini katalizler.

Bu analizlerin başlangıç noktası, laktoz kullanımında yer alan genlerin düzenlenmesi yönünden kusurlu mutantların ayırt edilmesi olmuştur. Bu mutantlar iki tipte idi: laktoz yokluğunda her üç genin de eksprese olduğu konstitütif mutantlar ve laktoz varlığında dahi genlerin ekspresyonunun başarısız olduğu uyarılamayan mutantlar. Bu regülasyon mutantları, genetik haritalama ile, *o* ve *i* olarak adlandırılan iki farklı lokusta belirlendi, *o* β-galaktozidaz yapısal geninin hemen yukarısında bulunmaktaydı. Sonuçta, *o*'yu etkileyen mutasyonların konstitütif ekspresyona neden olduğu; *i*'nin mutantlarının ise, ya konstitütif ya da uyarılamayan oldukları belirlendi.

Bu regülatör genlerin fonksiyonları, iki bakteri hattının çiftleştirilmesi sonucunda her iki atadan gelen genleri de içeren diploid hücrelerde yapılan deneylerle araştırılmıştır (Şekil 6.8). Bu gibi

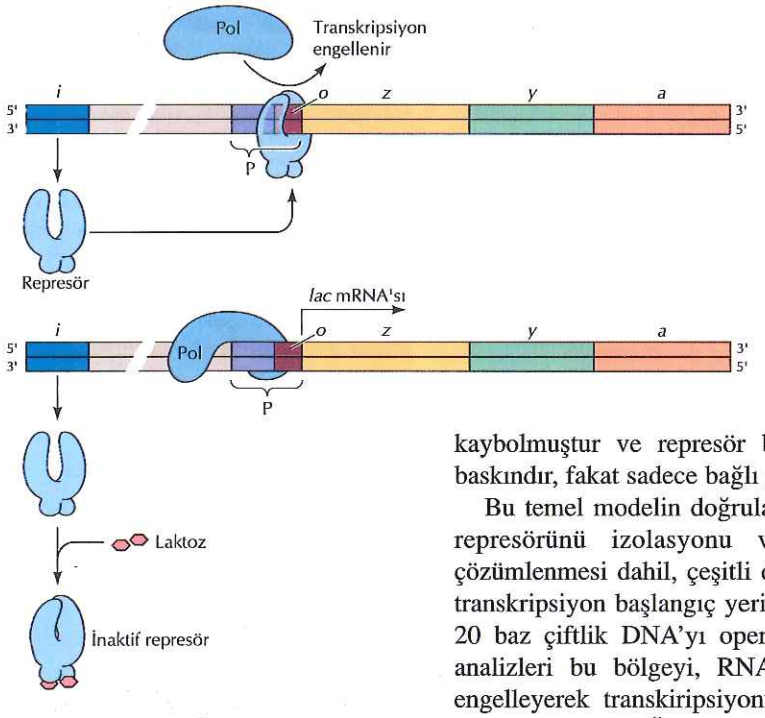


Şekil 6.8 Diploid *E. coli* de β-galaktozidazın regülasyonu
İki bakteri hattının eşleşmesi, her iki atadan da genleri içeren diplod hücrelerle sonuçlanır. Bu örnekte, β-galaktozidazı kodlayan genlerin (z genleri), z^1 ve z^2 olarak simgelenen yapısal gen mutasyonlarına göre ayırt edilebileceği varsayıldı. Diploid i^+/i^- hücrelerde (solda) her iki yapısal gen de uyarılabilirdir; bu nedenle, i^+ i^-'e baskındır ve her iki kromozomdaki z geninin ekspresyonunu etkiler. Bunun tersine, o^c/o^+ diploidlerde (sağda), z geni o^+ya bağlı olduğunda uyarılabilir iken, o^c'ye bağlı olduğunda konstitütif olarak eksprese olur. Bu nedenle, o yalnızca aynı kromozom üzerindeki bitişik z geninin ekspresyonunu etkiler.

diploid bakterilerde yapılan gen ekspresyonu analizleri, hangi düzenleyici gen allellerinin baskın, hangilerinin çekinik olduğunun belirlenmesiyle önemli bilgi üretmiştir. Örneğin, normal *i* geni (i^+) taşıyan bakteri, *i* geninde konstitütif ekspresyon mutasyonu (i^- mutasyonu) taşıyan bakteri ile eşleştirildiği zaman sonuçta ortaya çıkan diploid bakteri, normal uyarılabilirlik gösterdi; bu nedenle normal i^+ geni i^- genine baskındır. Bunun aksine, normal bakteri ve o^c (konstitütif ekspresyon) mutasyonlu bakteri arasındaki eşleşmenin ürünü olan konstitütif ekspresyon fenotipi, o^cnin o^+ya baskın olduğunu gösterdi. *o* ve *i* mutasyonlarının yapısal genlerdeki farklı mutasyonlarla birlikte kullanıldığı ek deneyler, *o*'nun, yalnız fiziksel olarak bağlı genlerin ekspresyonunu etkilerken, *i*'nin diploid bakteride bulunan her iki kromozom kopyasındaki genlerin ekspresyonunu da etkilediğini gösterdi. Bu sonuçla, bir o^c/o^+ hücrede, sadece o^c'ye bağlı yapısal genlerin konstitütif olarak ekspre olduğu belirlendi. Bunun aksine, bir i^+/i^- hücrede, her iki kromozomdaki yapısal genler normal olarak regüle edilir. Bu sonuçlar, *o* nun bitişik genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir DNA bölgesini betimlediği, *i* geninin ise, hücreye baştan başa yayılabilen ve her iki kromozomdaki genleri kontrol edebilen regülatör faktörler kodladığı (protein) yargısına yol açtı.

Bu deneyler esasında gelişen gen düzenlenmesi modeli, Şekil 6.9'da görülmektedir. β-galaktozidaz, permeaz ve transasetilazı kodlayan genler, **operon** olarak adlandırılan tek bir birimden eksprese olur. Operonun transkripsiyonu, transkripsiyon başlangıç yerine bitişik olan *o* (**operatör**) tarafından kontrol edilir. *i* geni operatöre bağlanarak transkripsiyonu denetleyen bir protein kodlar. i^- mutantları (konstitütif gen ekspresyonuna yol açan) çekinik olduğu için, bu mutantların fonksiyonel gen ürünü yapımında başarısız oldukları sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, normal *i* gen ürününün *o*'ya bağlandığında transkripsiyonu engelleyen bir **represör** olduğu anlamına gelmektedir. Laktoz represöre bağlanarak represörün opertör DNA'ya bağlanmasını önlediği için, operonun görevini yerine getirmesini laktoz yönetir. Uyarılamayan *i* mutantlarda (i^+'e baskındırlar) represör, laktoza bağlanmada başarısızdır ve bu nedenle operonun ekspresyonu indüklenemez.

Model, türemiş olduğu genetik deneylerin sonuçlarına çok uygundur. i^- hücrelerde, represör yapılmaz ve bu nedenle *lac* operonu, konstitütif olarak eksprese edilir. Fonksiyonel represör i^+, allel tarafından kodlandığı için, diploid i^+/i^- hücreler normal olarak uyarılabilir. Son olarak, o^c mutantlarda fonksiyonel operator



Şekil 6.9 *lac* operonunun negatif kontrolü
Gen *i*, laktozun yokluğunda (üst) operatöre bağlanan ve RNA polimerazın, üç yapısal genin (z, β-galaktozidaz; *y*, permeaz; *a*, transasetilaz) transkripsiyonunu gerçekleştirmek üzere promotöre bağlanmasını engelleyen, represörü kodlar. Laktoz, represöre (alt) bağlanarak represörün operatöre bağlanmasının önüne geçer ve operonun ekspresyonunu uyarır. P = promotör; Pol = polimeraz

kaybolmuştur ve represör bağlanamaz. Bu nedenle, o^c mutantlar baskındır, fakat sadece bağlı yapısal genlerin ekspresyonunu etkiler.

Bu temel modelin doğrulanması, 1960'larda Walter Gilbert'in *lac* represörünü izolasyonu ve operatör DNA'ya bağlanmasının çözümlenmesi dahil, çeşitli deneylerle sağlandı. Moleküler analizler, transkripsiyon başlangıç yerinden birkaç baz önce başlayan, yaklaşık 20 baz çiftlik DNA'yı operatör olarak belirledi. Ayak izi çıkarma analizleri bu bölgeyi, RNA polimerazın promotöre bağlanmasını engelleyerek transkiripsiyonu bloklayan represörün, bağlandığı yer olarak tanımladı. Önceden belirtildiği gibi, laktoz represöre bağlanır ve represör artık operatör DNA'ya bağlanamaz. Yine önceden bildirildiği gibi, o^c mutasyonları operatör içindeki dizileri değiştirir, böylelikle represörün bağlanmasını engeller ve konstitütif gen ekspresyonuna yol açar.

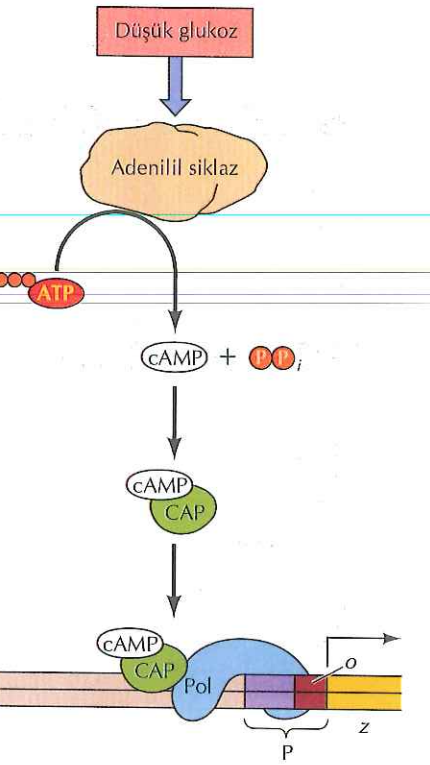
Laktoz operonu ile örneklenen gen kontrolünün temel ilkesi, transkripsiyonun, DNA dizileri ile regulatör proteinlerin etkileşimi yoluyla denetlenmesidir. Regülasyonun bu genel biçimi, prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisine de geniş ölçüde uygulanabilir. Sadece aynı DNA molekülünün üzerinde bağlı genlerin ekspresyonunu etkilediği için, regülatör dizi benzeri operatörler ***cis*-etkili kontrol elemanları** olarak adlandırılır. Diğer taraftan, hücre içindeki diğer kromozomlarda yerleşmiş olan genlerin ekspresyonunu etkileyebildiği için, represör benzeri proteinler ***trans*-etkili faktörler** olarak adlandırılır. Represörün bağlanması transkripsiyonu engellediği için, *lac* operonu negatif kontrole örnektir. Bu durum, her zaman bu şekilde gerçekleşmeyebilir; birçok *trans*-etkili faktör, transkripsiyonun inhibitörü değil, aktivatörüdür.

Transkripsiyonunun Pozitif Kontrolü

E.coli'de pozitif kontrolün en iyi çalışılmış örneği; glukozun, alternatif karbon ve enerji kaynağı sağlayan diğer şekerlerin (laktoz da dahil olmak üzere) sindiriminde (katabolizma) görevli enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisidir. Glukoz mevcut olduğu sürece, öncelikle glukoz kullanılır ve alternatif enerji kaynakları katabolizmasının enzimleri sentezlenmez. Örneğin *E.coli*, hem glukoz hem de laktoz içeren bir ortamda üretiliyorsa, *lac* operonu uyarılmaz ve bakteri tarafından yalnızca glukoz kullanılır. Böylece, normal uyarıcısının (laktoz) varlığında bile, glukoz *lac* operonunu baskılar.

Glukoz tarafından baskılanmanın (genellikle katabolit baskılanması olarak adlandırılır), siklik AMP (cAMP) düzeyine bağlı pozitif kontrol

Şekil 6.10 *Lac* operonunun glukoz ile pozitif kontrolü
Düşük glukoz seviyesi ATP'yi siklik AMP'ye (cAMP) çeviren adenilil siklazı aktive eder. Sonrasında siklik AMP katabolit aktivatör proteine (CAP) bağlanır ve laktoz gibi alternatif şekerlerin metabolizmaları ile ilgili, değişik operonların regülatör dizilerine bağlanması bu operonları uyarır. CAP, RNA polimerazın α altbirimi ile etkileşerek polimerazın promotöre bağlanmasını kolaylaştırır.



sistemi yoluyla sağlandığı bilinmektedir (Şekil 6.10). Bakterilerde ATP'yi cAMP'ye çeviren adenilil siklaz enzimi, gukoz düzeyi düştüğünde cAMP düzeyinin artmasını ayarlar. Daha sonra cAMP, katabolit aktivatör protein (CAP) olarak adlandırılan transkripsiyonel regülatör bir proteine bağlanır. cAMP'nin bağlanması, CAP'ın kendi hedef DNA dizisine bağlanmasını uyarır. Bu dizi, *lac* operonunun içinde ve transkripsiyon başlama yerinin 60 baz yukarısındadır. CAP bu durumda, RNA polimerazın alt birimi ile etkileşime girer ve polimerazın promotöra bağlanması ile, transkripsiyonun aktive edilmesine yardım eder.

Ökaryot RNA Polimerazları ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon süreci, bütün hücrelerde aynı temel mekanizmalarla gerçekleşmesine karşın, ökaryot hücrelerde, bakterilerdekinden çok daha karmaşıktır. Prokaryot ve ökaryot sistemleri arasında iki belirgin farklılık bulunur. Bunlardan ilki; bakteride bütün genler tek bir RNA polimeraz ile transkribe olurken, ökaryotik hücrelerin, farklı türdeki genleri kopyalayan birçok farklı RNA polimerazlar içeririyor olmasıdır. İkincisi; ökaryot RNA polimerazlarının, özgül olarak transkripsiyonu başlatmak için, promotör diziye doğrudan bağlanmak yerine, ek proteinler ile etileşime gereksinim duymasıdır. Ökaryot transkripsiyonun bu artan karmaşıklığı, olasılıkla, çok hücreli organizmaların çok farklı tip hücrelerinde faaliyetlerin yönetilmesi için gereksinim duyulan, gelişmiş gen ekspresyon regülasyonuna katkı sağlamaktadır.

Ökaryot RNA Polimerazları

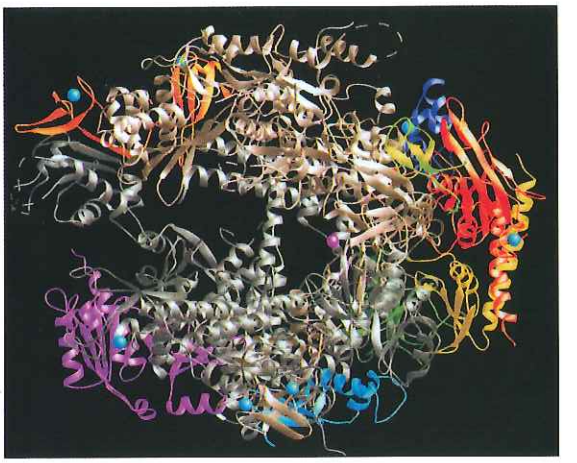
Ökaryot hücrelerde, değişik sınıf genlerin transkripsiyonunu gerçekleştiren, üç farklı nükleer RNA polimeraz bulunur (Tablo 6.1). Protein-kodlayan genlerin ürünü olan mRNA'lar, RNA polimeraz II tarafından sentezlenir; ribozomal RNA'lar (rRNA'lar) ve taşıyıcı RNA'lar (tRNA'lar) RNA polimeraz I ve III tarafından taranskribe edilirler. RNA polimeraz I, özgül olarak, rRNA'ların santirfügasyon sırasındaki çökme hızlarına göre, 28S, 18S ve 5.8S olarak adlandırılmış üç en büyük tipinin taranskripsiyonundan sorumludur. RNA polimeraz III, tRNA'lar ve ribozomal RNA'ların en küçük tipini (5S rRNA) kodlayan genleri transkribe eder. Kesip-ekleme işlemi ve protein taşınması ile ilgili küçük RNA'ların (snRNA ve scRNA) bazıları da RNA polimeraz III tarafından sentezlenir, diğerleri polimeraz II transkriptidir. Bunların dışında, kloroplast ve mitokondrilerde ayrı RNA polimerazlar (bakteriyal polimerazlara benzerler) bulunur ve özgül olarak nerede bulunuyorlarsa o organelin DNA'sını kopyalar.

Nükleer RNA'ların üçü de, 12 ile 17 arası alt birimden oluşan kompleks enzimlerdir. Farklı promotörleri tanımalarına ve farklı sınıf genleri transkribe etmelerine rağmen, her birinin hem diğerleriyle hem de bakteri RNA polimerazlarıyla bazı ortak belirleyici özellikleri

TABLO 6.1 Ökaryotik RNA Polimerazlar Tarafından Kopyalanan Gen Türleri

Sentezlenen RNA tipi	RNA polimeraz
Nükleer genler	
mRNA	II
tRNA	III
rRNA	
5.8S, 18S, 28S	I
5S	III
snRNA ve scRNA	II ve III[a]
Mitokondri genleri	Mitokondri[b]
Kloroplast genleri	Kloroplast[b]

[a] Bazı küçük nükleer (sn) RNA'lar ve küçük sitoplazmik (sc) RNA'lar polimeraz II, diğerleri Polimeraz III tarafından sentezlenir.
[b] Mitokondri ve kloroplast RNA polimerazları bakteri enzimlerine benzerdir.



Şekil 6.11 Maya RNA polimeraz II'sinin yapısı
Her alt birim farklı renklerle gösterilmiştir. (P.D. Kramer et al., 2001. *Science* 292: 1863'den)

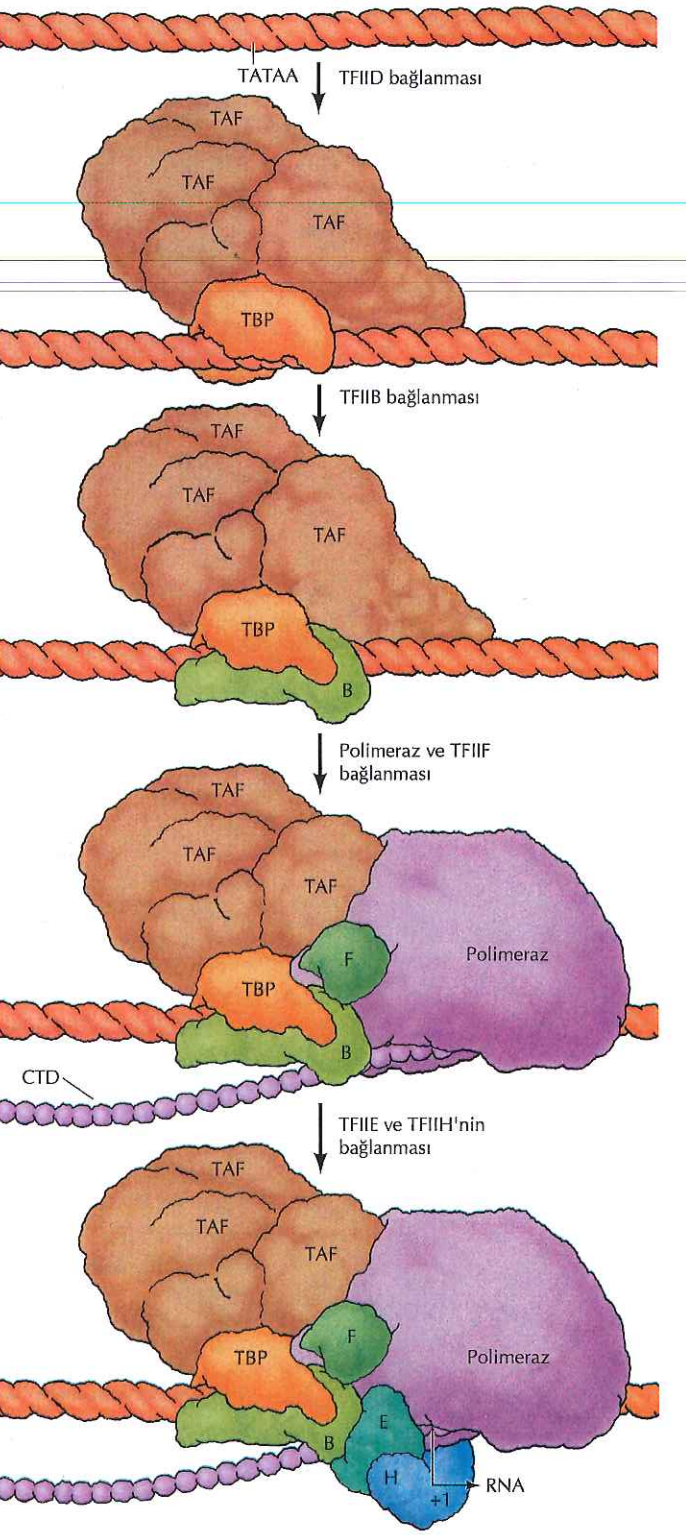
bulunur. Özellikle, her üç ökaryot RNA polimerazı da, dokuz korunmuş alt birim içeririr ve bunlardan beşi bakteri RNA polimerazın α, β, β' ve ω alt birimlerine benzerdir. X-ışını kristalog-rafisi ile maya RNA polimeraz II'nin yapısında yapılan yeni saptamalar, ökaryot RNA polimeraz yapılanmasının, bakteri enzimininkine, çarpıcı şekilde benzediğini, daha ileri düzeyde ortaya çıkardı (Şekil 6.11). Bu sonuç, bütün RNA polimerazların DNA'yı kopyalarken, belli başlı korunmuş mekanizmaları kullandıklarını göstermektedir.

Genel Transkripsiyon Faktörleri ve RNA Polimeraz II ile Transkripsiyonun Başlatılması

Protein-kodlayan genlerden mRNA sentezinden sorumlu olduğu için, ökaryotlardaki transkripsiyon çalışmalarının çoğunun ilgi odağı, RNA polimeraz II'dir. Bu enzimin analizinde ilk deneyler, aktivitesinin, prokaryot RNA polimerazınınkinden farklı olduğunu gösterdi. Saflaştırılmış RNA polimerazın promotör içeren DNA'ya eklenmesiyle, basitçe gerçekleştirilen *in vitro,* hatasız bakteri gen transkripsiyonu, ökaryot sistemlerde olası değildir. Bu farklılığın temeli, 1979'da Robert Roeder ve meslektaşları tarafından, RNA polimeraz II'nin, ancak reaksiyona bazı proteinler eklenirse transkripsiyona başlayabildiğinin gösterilmesiyle aydınlatıldı. Bu sonuçla, ökaryotik sistemde transkripsiyon için, polimeraz ile birleşik olmayan, farklı, başlangıç faktörlerinin (bakteri σ faktöründen farklı olarak) gerekli olduğu ortaya çıktı.

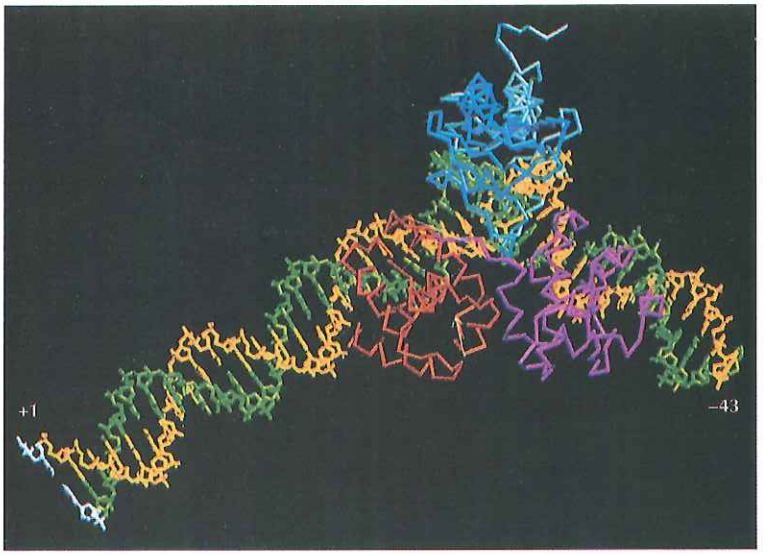
Nükleer özütün biyokimyasal bölümlenmesi, sonrasında, RNA polimerazın transkripsiyona başlaması için gerekli özgül proteinlerin (**transkripsiyon faktörleri** olarak adlandırılır) tanımlanmasına yol açtı. Gerçekten, bu faktörlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, ökaryot hücrelerde transkripsiyonun anlaşılması için devam eden çalışmaların en önemli kısmını oluşturmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin iki genel tipi tanımlanmıştır. **Genel transkripsiyon faktörleri**, bütün polimeraz II promotörlerinde transkripsiyon ile ilgilidir ve bu nedenle temel transkripsiyon mekanizmasının bir bölümünü oluşturur. Diğer, gene-özgün transkripsiyon faktörleri (bölüm içinde daha sonra ele alınacak) özel genlerin ekspresyonunu denetleyen DNA dizilerine bağlanırlar ve bu genlerin ekspresyon denetiminden sorumludurlar. İnsan genomundaki genlerin yaklaşık %5'inin transkripsiyon faktörü kodladığı tahmin edilmektedir ki, bu oran bu proteinlerin önemini vurgular.

Şekil 6.12 Polimeraz II transkripsiyon kompleksinin oluşumu
Polimeraz II promotörlerinin çoğunda, transkripsiyon başlama noktasının 25 ila 30 nükleotid yukarısında, TATA kutusu (TATAA ortak dizisi) bulunur. Bu dizi, TATA'ya-bağlanan protein (TBP) ve TBP-bağlanan faktörlerden (TAF'lar) oluşan transkripsiyon faktörü TFIID tarafından tanınır. Sonra TFIIB (B) TBP'ye bağlanır ve bunu TFIIF (F) ile birlikte, polimerazın bağlanması izler. En sonunda, TFIIE (E) ve TFIIH (H) komplekse eklenir.



Yeni oluşturulan *in vitro* sistemlerde, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun başlatılması için, beş genel transkripsiyon faktörü gereklidir (Şekil 6.12). Polimeraz II ile kopyalanan birçok genin promotörleri, transkripsiyon başlama noktasının 25 ila 30 nükleotid yukarısında TATAA benzeri bir dizi içerir. Bu dizi (**TATA kutusu** olarak adlandırılır), bakteri promotörlerinin -10 dizi elamanlarına benzer ve transkripsiyonun başlamasındaki rollerini, TATAA dizilerinde ortaya çıkan mutasyonların sonuçları göstermiştir. Transkripsiyon kompleksinin oluşumundaki ilk basamak, TFIID olarak adlandırılan (*TF* transkripsiyon faktörünü; *II* polimeraz II'yi belirtir) genel transkripsiyon faktörünün TATA kutusuna bağlanmasıdır. TFIID, TATAA konsensus dizisine spesifik olarak bağlanan **TATA'ya-bağlanan protein** (**TBP**) ve **TBP-bağlanan faktörler** (**TAF**) olarak adlandırılan yaklaşık 10 diğer polipeptidi içeren, çok sayıda alt birimden oluşmuştur. TFIID'nin bağlanmasını, ikinci genel transkripsiyon faktörünün (TFIIB) gruba eklenmesi izler; bu faktör, bazı promotörlerde TATA kutusunun yukarısında bulunan DNA dizilerine bağlandığı gibi, TBP'ye de bağlanır (Şekil 6.13). TFIIB, RNA polimeraz II'ye bir köprü işlevi görerek, üçüncü faktör TFIIF ile birlikte, TBP-TFIIB kompleksine bağlar.

RNA polimeraz II'nin promotöre katılımının ardından, transkripsiyonun başlaması için iki faktörün (TFIIE ve TFIIH) daha bağlanması gereklidir. TFIIH, en az iki önemli rolü olan çok-alt birimli faktördür. İlk olarak, TFIIH'nin iki alt birimi, başlama yeri yakınlarındaki DNA'yı çözen helikazlardır. (TFIIH nin bu birimleri, Bölüm 5'de ele alındığı gibi nükleotid kesip çıkarma onarımı için gerekli olan XPB ve XPD proteinleridir.) TFIIH'nin diğer alt birimi, RNA polimeraz II'nin en büyük alt biriminin C-ucu bölgesinde bulunan tekrarlayan dizileri fosforilliyen bir protein kinazdır. Polimeraz II C-ucu domeyni (veya CTD), yedi amino asidin sıralı tekrarları (mayada 27 ve insanda 52 tekrar) ile Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-

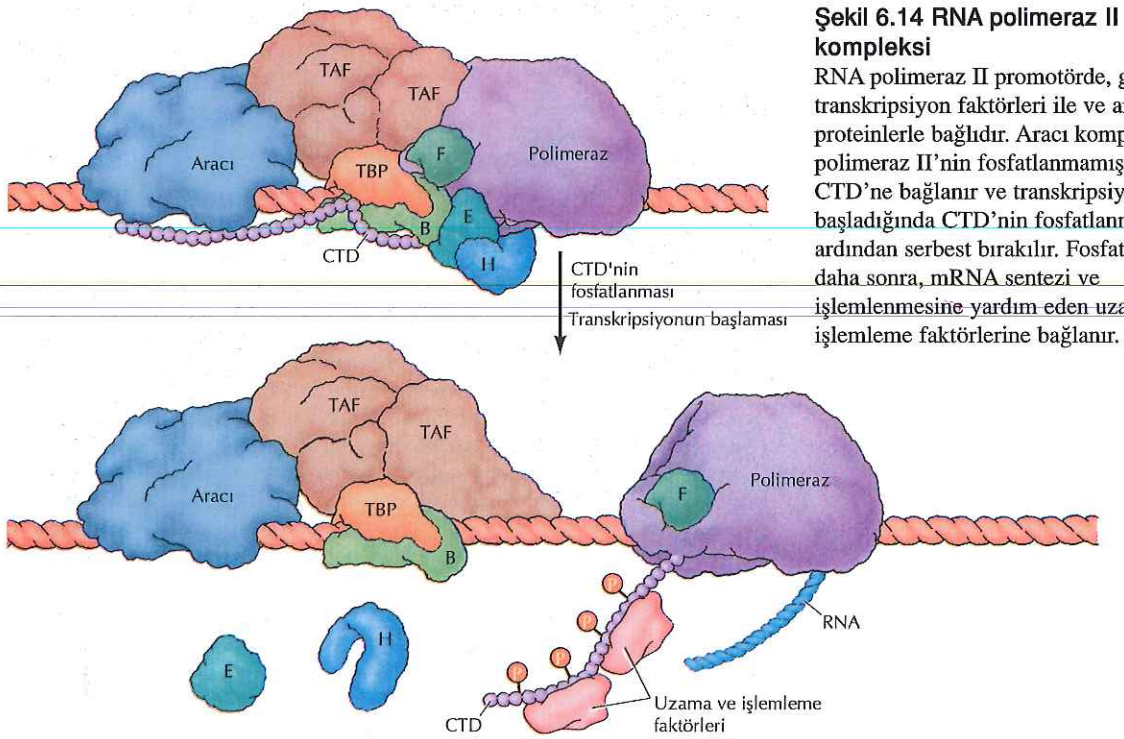


Şekil 6.13 DNA'ya bağlı TBP-TFIIB kompleksinin modeli
DNA, çubuk şekillerle oluşturulmuş sarı ve yeşil iplikler şeklinde görülüyor, transkripsiyon başlama yeri +1 ile belirtilmiştir. TBP, açık mavi ve koyu mavi renklendirilmiş, iki tekrardan oluşur. TFIIB tekrarları turuncu ve mor renklendirilmiştir. TBP bağlanmasının, DNA'yı yaklaşık olarak 110° büktüğüne dikkat ediniz. (D.B. Nikolov et al., 1995. *Nature* 377:119'dan)

Pro-Ser ortak dizilerinden oluşur. Bu amino asitlerin fosfatlanması; polimerazı, ön başlama kompleksiyle olan birlikteliğinden ayırır, polimerazın transkripsiyonu başlatmasını sağlayan diğer protein birleşimlerine öncülük eder ve mRNA zincir sentezi başlar.

RNA polimeraz II tarafından kopyalanan birçok genin promotörlerinde, TATA kutusuna ek olarak, transkripsiyon başlama yerini kapsayan önemli bir ikinci dizi elemanı (başlatıcı, veya Inr, dizini) vardır. Bundan başka, bazı RNA II promotörleri TATA kutusu olmaksızın yalnız Inr elemanına sahiptir. TATA kutusu içermeyen, Inr elemanı olan birçok promotör, transkripsiyon başlama yerinin 30 baz çifti aşağısında yerleşik, Inr dizisi ile işbiriliği içinde işlev yapan diğer bir promotör eleman (DPE) içerir. TBP'nin TATA dizisine doğrudan bağlanarak bu promotörleri açıkça tanıyamamasına rağmen, bu promotörlerde başlangıç için, yine de, TFIID (ve TBP) gereklidir. Aslında, Inr ve DPE dizilerine, TFIID'nin diğer alt birimleri (TAF'lar) bağlanmaktadır. TAF'ların bu elemanlara bağlanması, TBP'yi promotöre bağlar ve sonra TFIIB, polimeraz II ve ilave transkripsiyon faktörleri daha önce tanımlandığı gibi birleşir. Böylece TBP, TATA kutusuz promotörlerde bile polimeraz II transkripsiyonunun başlamasında temel bir rol oynar.

Her ne kadar, yukarıda anlatılan beş genel transkripsiyon faktörü ile RNA polimeraz II'nin sırayla birleşmesi, *in vitro* transkripsiyon için gerekli minimal sistemi oluşturuyor ise de, hücrede ilave faktörler gereklidir. Bu faktörler, polimerazın, gen ekspresyonunu düzenleyen gen-özgün transkripsiyon faktörlerine yanıtını sağlayan **aracı** protein kompleksini kapsar. Maya ve memeli hücrelerininde RNA polimeraz fraksiyonu, polimerazın aracı proteinler ile birleşik büyük kompleksler biçiminde (RNA polimeraz II holoenzim olarak adlandırılır) bulunduğunu ve buna genel transkripsiyon faktörleri TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH setinin de katıldığını gösterdi. Aracı proteinler polimeraz II'nin C-ucu domeynine birleşiktir ve ön başlama kompleksinin biraraya gelmesi ve polimeraz C-ucunun fosfatlanmasını takiben polimerazdan ayrılırlar (Şekil 6.14). Bu bölümde daha sonra ele alınacağı gibi, fosfatlı CTD sonrasında, transkripsiyonun devamını sağlayan ve mRNA işlemlenmesinde görevli diğer proteinlere bağlanır.

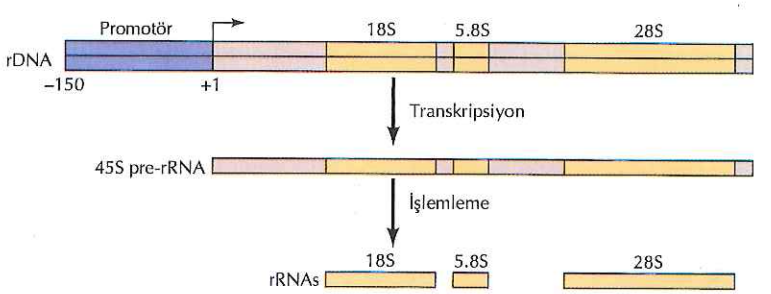


Şekil 6.14 RNA polimeraz II / Aracı kompleksi
RNA polimeraz II promotörde, genel transkripsiyon faktörleri ile ve aracı proteinlerle bağlıdır. Aracı kompleks, polimeraz II'nin fosfatlanmamış CTD'ne bağlanır ve transkripsiyon başladığında CTD'nin fosfatlanmasının ardından serbest bırakılır. Fosfatlı CTD, daha sonra, mRNA sentezi ve işlemlenmesine yardım eden uzama ve işlemleme faktörlerine bağlanır.

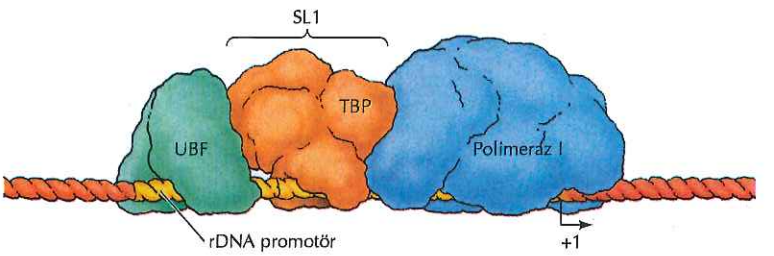
RNA Polimeraz I ve III ile Transkripsiyon

Önceden ele alındığı gibi, ökaryot hücrelerde ribozomal ve taşıyıcı RNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonundan farklı RNA polimerazlar sorumludur. Bununla birlikte, her üç RNA polimeraz da, uygun promotör diziler ile birleşmek için, ilave transkripsiyon faktörlerine geriksinim gösterir. Bunun yanında, ökaryot hücrelerdeki üç farklı polimerazın farklı tipte promotörleri tanımalarına rağmen, ortak transkripsiyon faktörü –TATA'ya bağlanan protein (TBP)- her üç enzimle transkripsiyonun başlaması için de gerekli gözükmektedir.

RNA polimeraz I tümüyle, sıralı tekrar halindeki ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonuyla yükümlüdür. Bu genlerin transkripsiyonu, büyük bir 45S pre-rRNA ürünü verir. Bu ürün sonradan, 28S, 18S ve 5.8S rRNA ürünlerine işlemlenir (Şekil 6.15). Ribozomal RNA genelerinin promotörü, transkripsiyon başlama yerinin hemen yukarısında, yaklaşık 150 baz çiftlik bir bölgeyi kapsar. Bu promotör diziler, iki transkripsiyon faktörü tarafından tanınır; UBF (yukarı, *upstream*, bağlanma faktörü) ve SL1 (seçicilik faktörü 1). Bu



Şekil 6.15 Ribozomal RNA geni
Ribozomal DNA (rDNA), sonradan 28S, 18S, ve 5.8S rRNA'lara ayrılacak olan, büyük bir RNA molekülüne (45S pre-rRNA) kopyalanır.



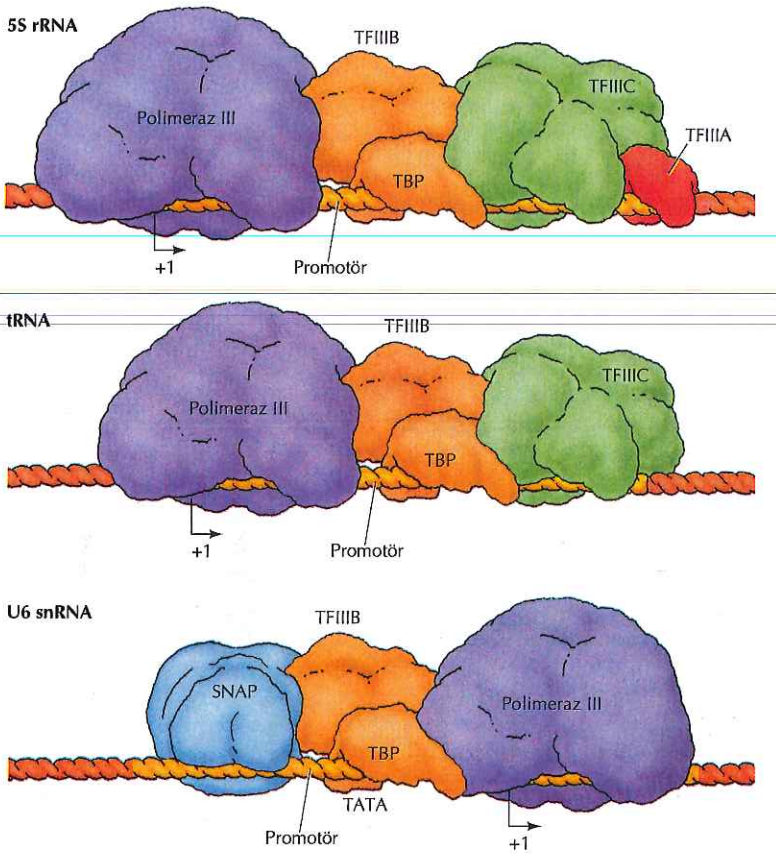
Şekil 6.16 rDNA transkripsiyonunun başlaması
İki transkripsiyon faktörü, UBF ve SL1, rDNA promotörüne birlikte etkileşerek bağlanır ve başlama kompleksi yapısına RNA polimeraz I'in katılımını sağlarlar. SL1'in bir alt birimi, TATA'ya-bağlanan proteindir (TBP).

faktörler, promotöre işbirliği yaparak bağlanır ve sonrasında, başlama kompleksi oluşturmak üzere, yapısına RNA polimeraz I katılır (Şekil 6.16). SL1 transkripsiyon faktörü, dört adet protein alt birimden oluşur ve bunlardan biri TBP dir. TBP nin rolü, TBP mutasyonu taşıyan mayalarda, yalnız polimeraz II transkripsiyonunun değil polimeraz I ve III ile transkripsiyonların da yapılamadığının bulunmasıyla, direkt olarak gösterilmiştir. Demek ki TBP, ökaryot RNA polimerazlarının her üç sınıfı için de gerekli temel bir transkripsiyon faktörüdür. Ribozomal RNA genlerinin promotörleri TATA kutusu içermediğinden, TBP spesifik promotör diziye bağlanmaz. Onun yerine, TBPnin ribozomal RNA genleri ile olan birleşmesine, SL1 kompleksindeki diğer proteinlerin promotöre bağlanması, aracılık eder. Bu durum, TATA kutusuz polimeraz II genlerinin Inr dizilerinin TBP ile olan birleşimine benzer.

Taşıyıcı RNA'ların, 5S rRNA'nın ve kesip-ekleme ve protein taşınması ile ilişkili bazı küçük RNA'ların genleri, polimeraz III tarafından kopyalanır. Bu genler, üç farklı promotör sınıfından transkribe edilir, bunlardan ikisi, transkribe edilen dizinin yukarısında değil, dizinin içinde yer alır (Şekil 6.17). Polimeraz III tarafından kopyalanan genler içerisinde en detaylı şekilde çalışılanı, *Xenopus*'un 5SrRNA genleridir. TFIIIA (saflaştırılan ilk transkripsiyon faktörüdür), 5SrRNA promotöründeki spesfik DNA dizisine bağlanarak, transkripsiyon kompleksinin yapılanmasını başlatır. Bu bağlanmayı sırayla, TFIIIC, TFIIIB ve polimerazın bağlanması izler. tRNA genlerinin promotörleri, TFIIIA tarafından tanınan DNA dizisi içermemeleriyle, 5SrRNA promotörlerinden farklıdır. Onun yerine, tRNA genlerin promotörüne direkt olarak TFIIIC bağlanır ve transkripsiyon kompleksini yapılandırmak üzere, TFIIIB ve polimerazın katılımını sağlar. Polimeraz III tarafından transkribe edilen genlerin üçüncü grubunu, kesip-ekleme ile ilgili küçük nükleer RNA'ların bazılarını kodlayan genleri içerir ve bunların promotörleri, transkripsiyon başlama noktasının yukarısında yerleşiktir. Bu promotörler, hem TATA kutusu (polimeraz II genleri için olan promotörler gibi), hem de SNAP adı verilen diğer bir faktör için bağlanma yeri, içerirler. SNAP ve TFIIIB, TFIIIB'nin direkt olarak TATA kutusuna bağlanmasını takiben, bu promotöre, birlikte bağlanırlar. Bu olay, TFIIIB'nin alt birimi olan TATA'ya-bağlanan protein, TBP, aracılığı ile gerçekleşir. Diğer RNA polimeraz III genlerinin promotörlerinde olduğu gibi, TFIIIB, polimerazın transkripsiyon kompleksine katılmasını sağlar.

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi

Ökaryotlarda gen ekspresyon kontrolü, bakterilere göre çok daha karmaşık olmakla beraber, aynı temel ilkeler etkilidir. Ökaryot genlerinin ekspresyonu, çoğu durumda zincir uzaması sırasında da denetlenmekle birlikte, öncelikle transkripsiyonun başlama



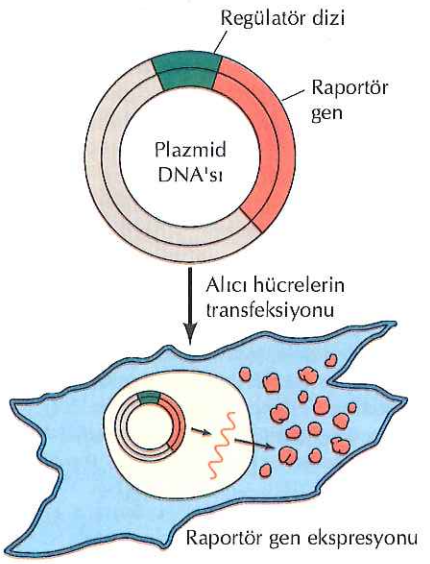
Şekil 6.17 Polimeraz III genlerinin transkripsiyonu
Polimeraz III ile kopyalanan genler, üç tip promotör ile eksprese edilir. 5S rRNA'nın ve tRNA genlerinin promotörleri, transkripsiyona başlama yerinin aşağı yönündedir. 5SrRNA geninin transkripsiyonu, TFIIIA bağlanması ile başlar ve bunu TFIIIC, TFIIIB ile polimerazın bağlanması takip eder. tRNA promotörleri TFIIIA için bağlanma yeri içermez ve transkripsiyonları için TFIIIA gerekli değildir. Onun yerine, tRNA genlerinin transkripsiyonunu promotöre bağlanan TFIIIC başlatır ve bunu TFIIIB ve polimerazın birleşmesi takip eder. U6 snRNA geninin promotörü, transkripsiyon başlama yerinin yukarısındadır ve TFIIIB'nin altbirimi olan TATA'ya-bağlanan protein (TBP) tarafından tanınan TATA kutusu içerir. TFIIIB, SNAP olarak adlandırılan diğer bir faktör ile birlikte bağlanır.

aşamasında kontrol edilir. Bakteride olduğu gibi, ökaryot hücrelerde de transkripsiyon, özgül düzenleyici dizilere bağlanan ve RNA polimerazın aktivitesini ayarlayan proteinler tarafından kontrol edilir. Prokaryot ve ökaryot hücreler arasında, transkripsiyon regülasyonu açısından önemli fark, ökaryot DNA'sının kromatine paketlenmesi sonucu, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilirliğinin sınırlanmasıdır. Sonuç olarak, kromatin yapısının değişiklikleri, ökaryotlarda transkripsiyon kontrolünde anahtar rolü oynar.

cis-Etkili Regülatör Dizileri: Promotörler ve Güçlendiriciler

Daha önce tartışıldığı gibi, bakteride transkripsiyon, bitişik genlerin transkripsiyonunu kontrol eden *cis*-etkili dizilere (örn., *lac* operatörü) proteinlerin bağlanması ile denetlenir. Benzer *cis*-etkili diziler, ökaryot genlerinin ekspresyonunu da düzenler. Bu diziler, memeli hücrelerinde çoğunlukla, klonlanmış genlerin regülatör olduğu düşünülen bölgelerinin aktivite çalışmalarında, gen transferi analizleri kullanılarak tanımlanmıştır (Şekil 6.18). Ökaryot regülatör dizileri, genellikle, kolayca saptanabilen bir enzimi kodlayan bir raportör gene bağlanır. Raportör genin kültürdeki hücrelere transferini, genin ekspresyonunun izlemesi, klonlanan regülatör dizinin transkripsiyona olan direkt etkisini incelemek için duyarlı bir düzenek sağlar. Böylece, biyolojik olarak aktif olan regülatör bölge tanımlanabilir ve bölgenin içindeki spesfik dizilerin rollerinin belirlenmesinde de, *in vitro* mutagenez yöntemi kullanılabilir.

RNA polimeraz II ile kopyalanan genlerin, genel transkripsiyon faktörleri için özgül bağlanma bölgesi oluşturan, TATA kutusu ve Inr

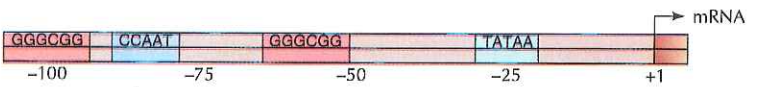


Şekil 6.18 Ökaryot regülatör dizilerinin tanımlanması
Klonlanmış bir ökaryot hücrenin regülatör dizisi, kolay belirlenebilen bir enzimi kodlayan raportör gene bağlanır. Elde edilen plazmid, kültürdeki alıcı hücrelere transfeksiyon ile verilir. Aktif regülatör dizi raportör genin transkripsiyonunu yönetir ve enzim transfekte hücrelerde belirlenir.

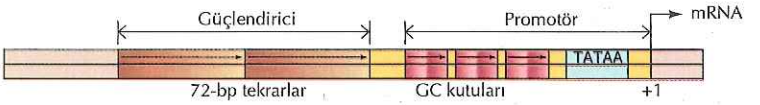
dizilerini de kapsayan ana promotör elemanları vardır. Diğer *cis*-etkili diziler, özel genlerin ekspresyonunu kontrol eden regülatör faktörlerin geniş bir türü için, bağlanma yeri olarak iş görür. Bu *cis*-etkili regülatör diziler, her zaman olmasa da sıklıkla, TATA kutusunun yukarı yönünde yerleşiktir. Örneğin; pek çok ökaryot gende bulunan iki regülatör dizi, herpes simleks'in timidin kinaz kodlayan geninin promotörünün incelenmesiyle tanımlanmıştır (Şekil 6.19). Bu dizilerin her ikisi de, TATA kutusunun 100 baz çifti yukarısında yerleşiktir ve konsensus dizileri CCAAT ve GGGCGG dir (GC kutusu olarak adlandırılır). Bu dizilere bağlanan ve transkripsiyonu uyaran özgün proteinler, daha sonra tanımlanmıştır.

Herpes timidin kinaz promotöründeki CCAAT ve GC kutularının göreceli basit organizasyonunun aksine, memeli hücrelerindeki pek çok gen, transkripsiyon başlangıç yerine daha uzak olarak (bazen 10 kilo bazdan fazla) yerleşmiş regülatör diziler tarafından kontrol edilir. Bu diziler, **güçlendirici (enhancer)** olarak adlandırılır ve ilk kez, diğer bir virüs olan SV40'ın promotörünün incelenmesi sırasında tanımlanmıştır (Şekil 6.20). Bu promotörden transkripsiyonun verimliliği için, TATA kutusu ve altı GC kutusu setine ilave olarak, daha yukarıda yerleşik iki tane 72-baz-çiftlik tekrar gereklidir. Bu dizilerin, transkripsiyonu, SV40'ın diğer promotörlerinde de olduğu gibi uyardığı bulunmuştur ve aktiviteleri, şaşırtıcı bir şekilde, ne uzaklıklarına ne de transkripsiyon başlama yerine göreli yönlerine bağlı değildir (Şekil 6.21). Bu diziler, transkripsiyonu, promotörün hem, yukarı veya aşağı yönünde yerleştiklerinde hem de ileri ya da geri yönde yerleştikleri zaman uyarabilirler.

Güçlendiricilerin, transkiripsiyon başlama yerinden oldukça uzakta bulunduklarında dahi iş görebilmeleri, önce, promotörlerden farklı bir mekanizmayla çalıştıklarını düşündürmüştür. Ancak, durumun böyle olmadığı anlaşıldı: Güçlendiriciler de, promotörler gibi, RNA polimerazı denetleyen transkripisyon faktörlerinin bağlanmasıyla işlev görürler. Bu olay, uzaktaki güçlendiriciye bağlanan transkripsiyon faktörlerinin, promotör bölgede RNA polimeraza bağlanan proteinlerle etkileşmesine olanak veren, DNA ilmiklenmesi sayesinde mümkün olur (Şekil 6.22). Böylece, uzak güçlendiricilere bağlanan transkripsiyon faktörleri, bitişik promotörlere bağlananlarla aynı mekanizma ile çalışmaktadır. Güçlendiricilerin çalışma şekli ile, transkripsiyon başlama noktasına bitişik *cis*-etkili regülatör dizilerinki arasında, temel bir farlılık yoktur. İlginç şekilde, güçlendiriciler, önce memeli hücrelerinde tanımlandıktan sonra bakterilerde de bulundu– ökaryot çalışmalarının, daha basit prokaryot sistemler için bir model olarak işe yaradığı, alışılmadık bir durum.

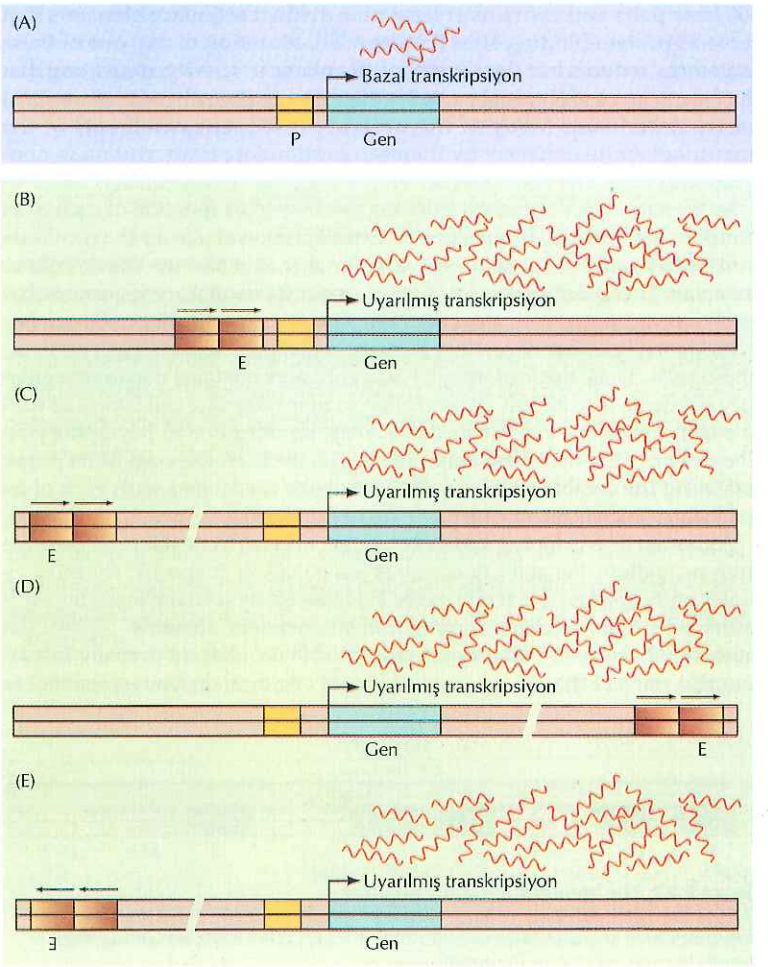


Şekil 6.19 Ökaryotik bir promotör
Herpes simpleks virusunun timidin kinaz geni promotörü, TATA kutusunun yukarısında, verimli transkripsiyon için gerekli üç dizi elemanı içerir: bir CCAAT kutusu ve iki GC kutusu (konsensus dizisi GGGCGG).

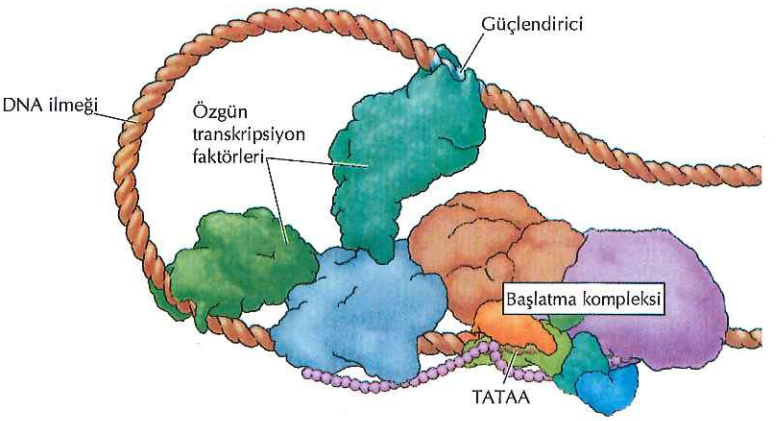


Şekil 6.20 SV40 güçlendiricisi
SV40'ın erken gen ekspresyonu için kullandığı promotörü, TATA kutusu ve üç seri halinde tekrarlanan altı GC kutusu içerir. Buna ek olarak, verimli transkripsiyon için ayrıca, yukarı yönde iki adet 72-baz-çiftlik (bp) tekrardan oluşmuş güçlendirici gereklidir.

Özgül transkripsiyon düzenleyici proteinlerin güçlendiricilere bağlanması, gelişim ve farklılaşma süreçlerinde olduğu gibi, hücrelerin hormonlara ve büyüme faktörlerine yanıtı sırasında da, gen ekspresyonunun kontrolünden sorumludur. En detaylı çalışılan memeli güçlendiricilerinden biri, B lenfositlerde immünglobulin genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden güçlendiricidir. Gen transferi deneyleri, immünglobulin güçlendiricisinin lenfositler dışındaki hücrelerde aktif olmadığını ortaya çıkardı. Bu sonuca göre, bu regülatör diziler, uygun farlılaşmış hücrelerde immünglobulin genlerinin dokuya-özgül ekspresyonlarından, en azından, kısmen sorumludur.



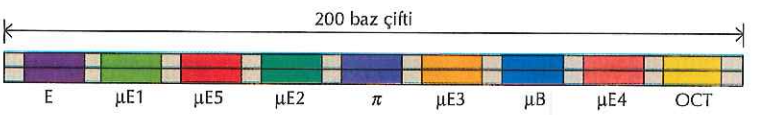
Şekil 6.21 Güçlendiricilerin çalışma şekli
Güçlendirici etkisinde olmayan gen, düşük seviyede transkripsiyon yapar (A). Bir güçlendirici, E, eklenmesi–örneğin, SV40'ın 72-baz-çifti tekrarları–transkripsiyonu uyarır. Güçlendirici, sadece promotörün tam yukarı yönüne yerleştiğinde (B) değil, transkripsiyon başlama yerinin birkaç kilobaz yukarısına veya aşağısına eklendiğinde de (C ve D) aktivite gösterir. Güçlendiriciler ayrıca, hem ileri, hem de geri oryantasyonda (E), aktiftir.



Şekil 6.22 DNA'nın ilmiklenmesi
DNA'nın ilmek oluşturabilmesi sayesinde, uzak güçlendiricilere bağlı transkripsiyon faktörleri, RNA polimeraz II/Aracı kopleksi veya promotördeki genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşebilirler. Bu yüzden, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya, promotörün tam yukarısında bağlanmaları ile uzak bir güçlendiriciye bağlanmaları arasında, işlevsellik açısından temel bir farklılık yoktur.

Güçlendiricilerin önemli bir diğer yönü, genellikle, farklı düzenleyici proteinlerin bağlandığı çok sayıda, işlevsel dizi elemanı içermeleridir. Bu proteinler beraberce, gen ekspresyonun düzenlenmesini sağlarlar. Örneğin, immünglobulin ağır-zincir güçlendiricisi, yaklaşık 200 baz çifti uzunluktadır ve protein-bağlayıcı yer olarak iş gören en az dokuz farklı dizi elemanı içerir (Şekil 6.23). Bu dizilerden her hangi birindeki bir mutasyon, güçlendirici aktivitesini düşürür, fakat durdurmaz. Bu durum, güçlendiriciye bağlanan bireysel proteinlerin fonksiyonlarının, en azından kısmen, gereksiz olduğunu gösterir. İmmünglobulin güçlendiricisinin özel dizi elemanlarından çoğu, lenfoid haricindeki hücrelerde, kendi başlarına transkripsiyonu uyarırlar. B lenfositlerindeki sağlam güçlendiricilerin kontrollü aktiviteleri, bileşenlerinin her birinin doku-özgül işlevlerinin sonucu değildir. Aksine, doku-özgül ekspresyon, eksiksiz bir güçlendiriciyi meydana getiren özel dizi elemanlarının, birleşiminden kaynaklanır. Bu elemanlar, hem B lenfositlerde özgül olarak eksprese edilen transkripsiyon aktivatörlerinin bağlandığı bazı *cis*-etkili düzenleyici dizileri, hem de, lenfoid dışı hücrelerde represörlerin bağlandığı diğer düzenleyici dizileri içerir. Buna göre, immunglobulin güçlendiricisi, hem uygun olmayan hücre tiplerinde transkripsiyonu engelleyen negatif düzenleyici elemanları, hem de B lenfositlerinde transkripsiyonu aktive eden pozitif düzenleyici elamanları içerir. Güçlendiricinin toplam aktivitesi, parçalarının toplam aktivitesinden büyüktür ve özel dizi elamanlarının her biriyle birleşik olan proteinlerin kombine etkisini yansıtır.

DNA ilmiklenmesi, her ne kadar, güçlendiricilere promotölerden önemli ölçüde uzaktan etkinlik olanağı sağlıyorsa da, herhangi bir belirli güçlendiricinin aktivitesi, kendi hedef geninin promotörü için özgüldür. Bu özgüllük, kromozomları bağımsız alanlara ayıran ve güçlendiricilerin, komşu bölgelerin promotörlerini etkilemesini engelleyen **yalıtıcılar** tarafından korunur. Yalıtıcılar aynı zamanda, bir



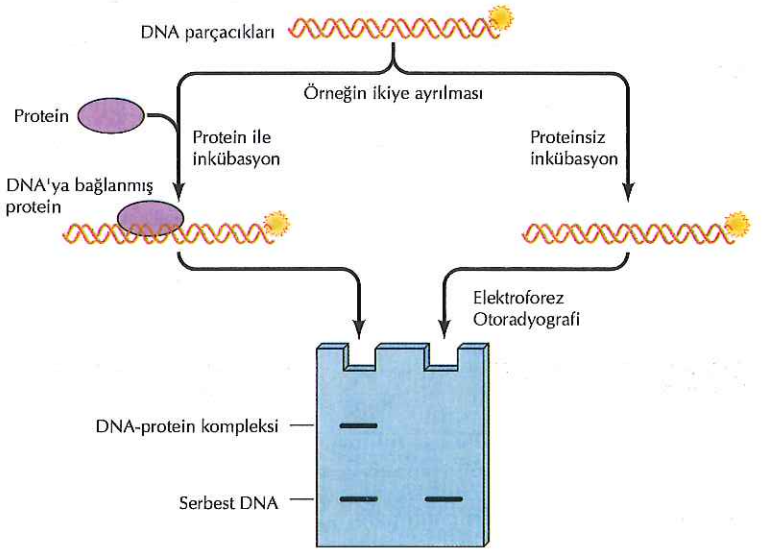
Şekil 6.23 İmmünglobulin güçlendiricisi
İmmünglobulin ağır-zincir güçlendiricisi, yaklaşık 200 baz uzuluktadır ve B lenfositlerde, beraberce transkripsiyonu uyaran dokuz işlevsel dizi elamanı (E, μE1-5, π, μB ve OCT) içerir.

alanın kromatin yapısının, komşularına yayılımını engelleyerek, genomda bağımsız düzenlenen bölgeler oluşturur.

Transkripsiyon Düzenleyici Proteinler

Çeşitli, transkripsiyon düzenleyici proteinlerin izolasyonu, promotör ve güçlendirici dizilere spesifik bağlanmalarına dayandırılmıştır. Bu DNA dizilerine bağlanan protein, genellikle iki tip deney ile analiz edilir. Bunlardan birincisi, ayak-izi-çıkarma, daha önce RNA polimerazın prokaryot promotörlerine bağlanmasıyla ilgili olarak anlatılmıştı (bkz. Şekil 6.3). İkinci yöntem olan **elektroforetik-devingenlik-değişim analizinde**, radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA parçacıkları, hazırlanmış proteinlerle uygun koşullarda bekletildikten sonra, denatüre etmeyen jelde elektroforeze tabi tutulur (Şekil 6.24). Protein bağlanması, DNA parçalarının elektroforetik devinimlerindeki azalmayla saptanır. Ayak-izi-çıkarma ile elektroforetik-devingenlik-değişim analizlerinin birlikte kullanımı, protein-bağlanma yerleri ile promotör ve güçlendiricilerin düzenleyici elemanları arasındaki uyumu ortaya koydu. Bu uyum, bu dizilerin, genellikle DNA'ya bağlanan özgül proteinlerin tanıma bölgeleri olduğunu gösterdi.

Ökaryot transkripsiyon faktörlerinin ilk örneklerinden biri, SV40 DNA'sının transkripsiyon çalışmaları sırasında, Robert Tjian ve arkadaşları tarafından, tanımlanmıştır. Bu faktörün (özgünlük /spesifisite proteini 1, Sp1 olarak adlandırılır), hücre içermeyen özütlerde, SV40 promotöründen transkripsiyonu uyarırken, diğer bazı promotörlerden uyarmadığı bulundu. Daha sonra, Sp1 ile transkripsiyon uyarılmasının, SV40 promotöründe GC kutusu bulunmasına bağlı olduğu keşfedildi: Bu diziler delesyonla uzaklaştırılırsa, Sp1 ile uyarım duruyordu. Üstelik, ayak-izi-çıkarma deneyleri, Sp1'in özgül olarak GC kutusu dizilere bağlandığını, kanıtladı. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, GC kutusunun, transkripsiyonel aktivatör Sp1 için spesifik bir bağlanma yerini simgelediği anlaşılmaktadır. Benzer deneyler, pek çok diğer transkripsiyon regülatör dizisinin, hem CCAAT dizisi ve immünglobulin güçlendiricilerinin çeşitli dizi elamanlarını, hem de,



Şekil 6.24 Elektroforetik-devingenlik- değişim analizi
Radyoaktif işaretli DNA parçaları içeren örnek ikiye bölünür ve yarısı spesifik DNA dizilerine bağlanan proteinler ile inkübe edilir. Sonra, proteinlerin DNA'ya bağlanmış olarak korunması için denatüre etmeyen jelde yapılan elektroforezle analiz edilir. Serbest DNA ile karşılaştırıldığında DNA-protein komplekslerinin daha yavaş göç etmelerinden, protein bağlantısı belirlenir. Örnekteki DNA'nın, aslında yalnız bir fraksiyonu proteine bağlıdır ve bu nedenle, DNA ile protein inkübasyonunu takiben, hem DNA-protein kompleksleri hem de serbest DNA bulunur.

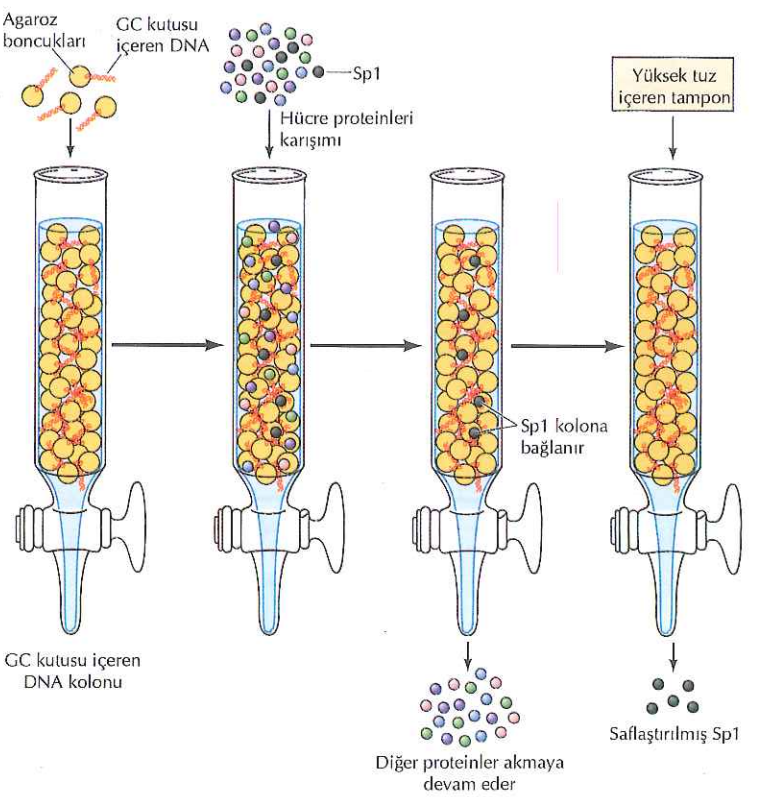
TABLO 6.2 Transkripsiyon Faktörü Örnekleri ve DNA'ya bağlanma bölgeleri

Transkripsiyon faktörü	Konsensus bağlanma bölgesi
Özgünlük proteini 1 (Sp1)	GGGCGG
CCAAT/güçlendiriciye bağlanan protein (C/EBP)	CCAAT
Aktivatör protein 1 (AP1)	TGACTCA
Oktamere bağlanan protein (OCT-1 ve OCT-2)	ATGCAAAT
E-kutusuna bağlanan proteinler (E12, E47, E2-2)	CANNTG[a]

[a] N herhangi bir nükleotid için kullanılır

diziye-özgül DNA'ya-bağlanan proteinler (Tablo 6.2) için tanıma dizileri içerdiğini kanıtladı.

Sp1'in GC kutusuna spesifik olarak bağlanması, sadece diziye-özgül transkripsiyon faktörü olarak davrandığını kanıtlamadı; aynı zamanda, transkripsiyon faktörlerinin saflaştırılması için genel bir yaklaşım da sundu. Bu proteinlerin izolasyonu, geleneksel biyokimya yöntemleriyle saflaştırılmalarının zor olduğu çok küçük miktarlarda (örn., total hücre proteinlerinin %0.001'i) olduklarından, ilkin, ürkütücü bir meydan okumaydı. Bu problem, Sp1'in **DNA-afinite kromotogrofisi** ile saflaştırılması ile çözüldü (Şekil 6.25). GC kutusu dizisine uygun çok sayıda oligonükleotid kopyası, katı bir kolon dolgu maddesine bağlandı ve hücre özütü bu kolonun içinden geçirildi. Sp1, GC kutusuna yüksek ilgiyle bağlandığı için, diğer proteinler



Şekil 6.25 Sp1'in DNA-afinite kromotografisi ile saflaştırılması Tekrarlayan GC kutusu dizileri içeren çift-iplikli oligonükleotidler, agoroz boncuklara bağlanır ve kolonun içine akıtılır. Sp1 içeren hücre proteinleri karışımı, kolona uygulanır; Sp1 spesifik olarak GC kutusu oligonükleotidlere bağlanır ve diğer proteinlere akmaya devam ederken, Sp1 kolonda tutulur. Kolonun yüksek tuz konsantrasyonunda bir tampon ile yıkanmasının ardından Sp1, GC kutusu DNA'dan ayrılır ve saflaştırılır.

ANAHTAR DENEY

Ökaryot Transkripsiyon Faktörlerinin İzolasyonu

Affinity Purification of Sequence-Specific DNA-Binding Proteins
James T.Kadonaga ve Robert Tjian
University of California, Berkeley
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volume 83, pages 5889-5893

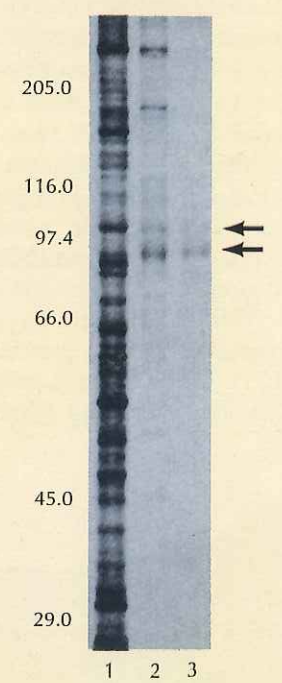
Robert Tjian

Bağlam

Jacob ve Monod'un *lac* operon çalışmalarının başlamasıyla, transkripsiyonun özgül DNA dizilerine bağlanan proteinler tarafından düzenlendiği anlaşıldı. Ökaryot hücrelerde gen ekspresyonu çalışmaları için öncül sistemlerden biri, 1980'lerin başlarında bir kaç düzenleyici dizisi tanımlanan, maymun virusu SV40 idi. William Dynan ve Robert Tjian, 1983'de ilk kez, bu dizi elemanlarından birinin (GC kutusu), insan hücrelerinin nükleer ekstraktında bulunan bir protein için özgül bir bağlanma yeri olduğunu, gösterdi. Bu protein (özgünlük / spesifisite proteini 1, Sp1 olarak adlandırılır), sadece GC kutusu dizilere bağlanmamakta, aynı zamanda, diziye özgül transkripsiyon aktivatörü olduğunu gösterir şekilde, *in vitro* transkripsiyonu da uyarmaktaydı..

Sp1'in etki mekanizmasının incelenmesi sırasında, transkripsiyon faktörünü saf olarak elde etmek ve sonunda *Sp1* genini klonlamak zorunlu hale geldi. Böylece, saf Sp1in izolasyonu, yüksek öncelikli bir iş, fakat aynı zamanda korkutucu bir teknolojik zorluk olarak ortaya çıktı.

Sp1 ve diğer transkripsiyon faktörleri, total hücre proteinlerinin yalnızca %0.001'ini oluşturduklarından, geleneksel biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılamıyorlardı. James Konaga ve Robert Tjian, DNA-afinite kromotografisi yöntemini geliştirerek, bu problemi çözdüler. DNA-afinite kromotografisi, yalnız Sp1'in saflaştırılmasını sağlamakla kalmadı, diğer pekçok ökaryot transkripsiyon faktörünün saflaştırılmasına da öncüllük etti. Bu suretle, ökaryot hücrelerde transkripsiyonel regülasyonun moleküler analizlerine bir kapı açtı.



Sp1'in saflaştırılması. Ham nükleer özütte bulunan başlangıçtaki proteinlerin (şerit 1) ve DNA-afinite kromotografisininin bir ya da iki ardışık döngüsünden elde edilmiş proteinlerin (sırasıyla, şerit 2 ve 3) jel elektroforezi. Belirteç proteinlerin büyüklükleri (kilodalton olarak), jelin sol tarafında belirtilmektedir ve Sp1 polipeptidleri okla işaretlenmiştir.

Deneyler

Kadonaga ve Tjian tarafından geliştirilen DNA-afinite kromotografisi metodu, Sp1'in GC kutusu dizisine (GGGCGG) özgül ve yüksek-ilgiyle bağlanmasından yararlanıyordu. Bu dizilerin çok sayıda kopyasını içeren sentetik oligonükleotidler, solid boncuklara bağlandı ve ham nükleer özüt, GC kutusu DNA'sı bağlanmış boncuklar içeren bu kolondan geçirildi. Sonrasında, oligonükleotidlere özgül olarak bağlanmamış proteinler, boncukların yıkanmasıyla uzaklaştırıldı. En sonunda, boncuklar, yüksek tuz tamponu (0.5*M* KCl) ile yıkanarak, Sp1'in DNA bağlantısı bozuldu ve böylece, Sp1 kolondan serbest bırakıldı.

Jel elektroforezi, başlangıçta kolona konulan ham nükleer özütün, kompleks bir protein karışımı olduğunu gösterdi (şekle bakınız). Bunun aksine, DNA-afinite kromotografisinin iki döngüsünden sonra, alınan proteinlerin yaklaşık %90'ı iki polipeptide uyum gösterdi. Bu polipeptidler, DNA'ya bağlanma ve *in vitro* transkripsiyon analizlerindeki aktiviteleri ile Sp1 olarak tanımlandı. Böylece, Sp1, DNA-afinite kromotografisi ile, başarılı bir şekilde saflaştırılmış oldu.

Etki

Kadonaga ve Tjian, 1986'daki makalelerinde, DNA-afinite kromotografisi yönteminin, "diğer diziye-özgül DNA'ya bağlanan proteinler için de genel olarak uygulanabilir" olduğunu belirttiler. Bu öngörü, yeterli bir şekilde doğrulanmıştır; bir çok ökaryot transkripsiyon faktörü, bu yöntemle saflaştırılmıştır. Diğer transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler, alternatif bir yöntemle (1988'de, Phillip Sharp ve Steven McKnight'ın laboratuvarlarında bağımsız olarak geliştirildi) izole edildi. Bu yöntemde, cDNA ekspresyon kütüphaneleri, spesifik olarak DNA dizilerine bağlanan rekombinant proteinleri bulmak için, oligonükleotid problarla taranmaktadır. Bu metodun diziye-özgül DNA-bağlayıcı proteinleri izole etme kapasitesi, transkripsiyonel regülatör proteinlerin geniş türlerinin yapı ve fonksiyonlarının ayrıntılı olarak tanımlanmasına öncülük etti ve ökaryot hücrelerde gen ekspresyonunu bu günkü anlayış düzeyimize çıkarmak için bir temel sağladı.

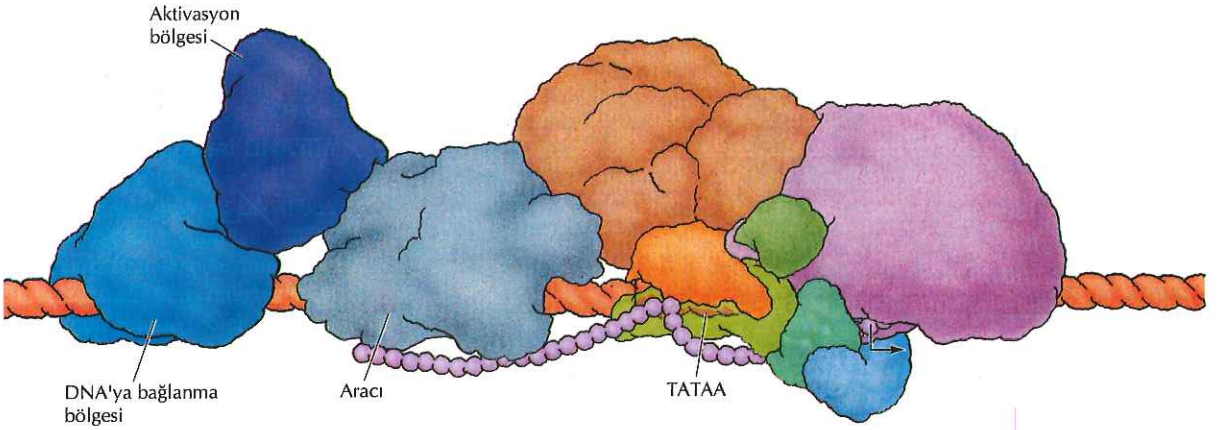
tutulmazken, özgül olarak kolon üzerinde tutulur. Sonrasında, yüksek saflıkta Sp1 elde edilebildi ve bu, Sp1 geninin klonlanmasına öncülük eden amino asit diziliminin kısmen belirlenmesini de kapsayan, daha ileri çalışmalar için kullanıldı.

İlk olarak Sp1'in saflaştırılması amacıyla optimize edilen, genel, DNA-afinite kromotografisi yöntemi, diziye-özgül DNA'ya-bağlanan proteinlerin bir çok tipinin, ökaryot hücrelerden izolasyonunda başarıyla kullanıldı. Diğer transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler, özgül DNA dizilerine bağlanan rekombinant proteinleri tanımlamak üzere, cDNA kütüphanelerinin taranmasıyla belirlendi. Transkripsiyon faktörlerinin cDNA'larının klonlanması ve dizi analizlerinin yapılması, bu önemli proteinlerin yapı ve fonksiyonları hakkında önemli miktarda bilginin birikmesini sağladı.

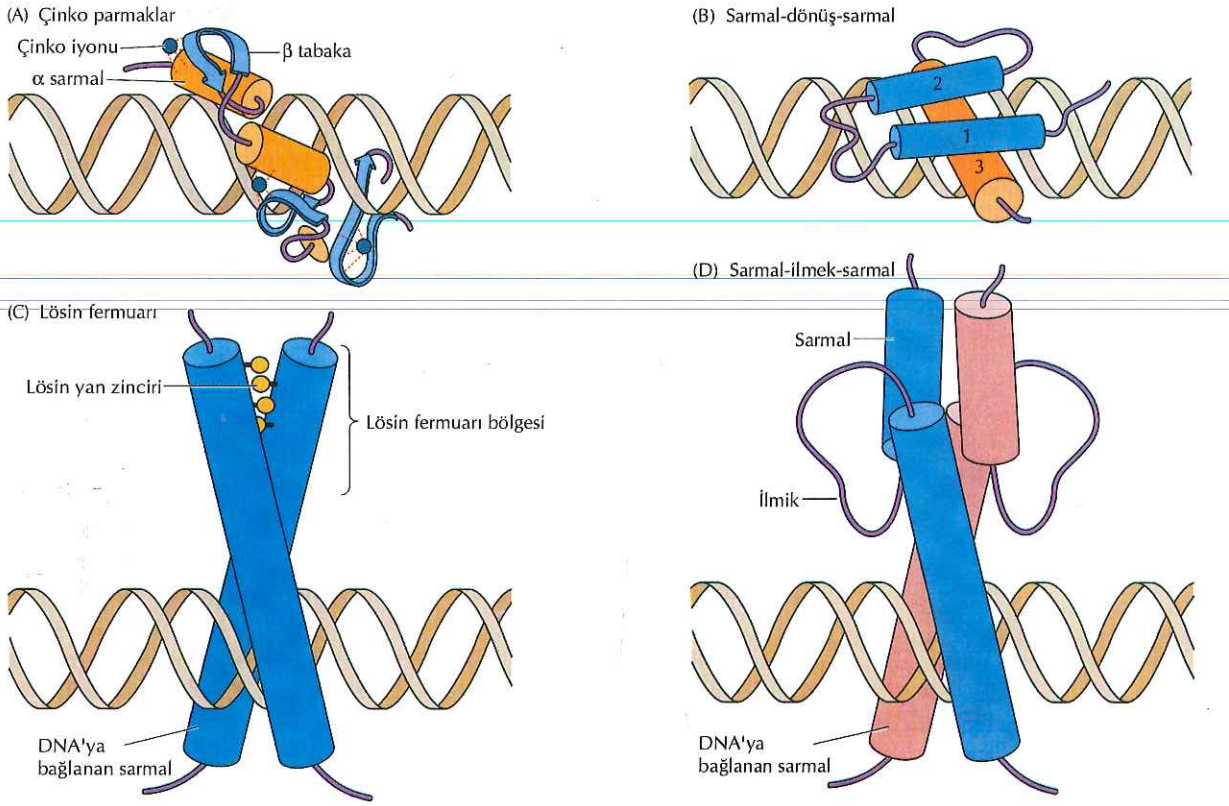
Transkripsiyon Aktivatörlerinin Yapı ve Fonksiyonu

Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonun düzenlenmesinde temel olduğu için, işlev mekanizmalarının anlaşılması, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide devam eden araştırmaların önemli ilgi alanıdır. Bu proteinlerden en detaylı incelenenler, Sp1 gibi, regülatör dizilere bağlanan ve transkripsiyonu uyaran **transkripsiyon aktivatörleridir**. Bu faktörler, genellikle iki bölgeden oluşur: Proteinin bir bölgesi özgül olarak DNA'ya bağlanır, diğeri ise, transkripsiyon sistemindeki bileşenleri de kapsayan proteinlerle etkileşerek transkripsiyonu uyarır (Şekil 6.26). Transkripsiyon aktivatörleri, modüler proteinler olduklarından, farklı faktörlerin DNA bağlanma ve aktivasyon bölgeleri, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak değiş tokuş edilebilir. Bu gibi işlemlerin sonucu, DNA'ya-bağlanma bölgelerinin belirlediği özgül promotör ya da güçlendirici dizilere bağlanarak transkripsiyonu aktive eden hibrid transkripsiyon faktörleridir. Bu durum, DNA'ya-bağlanma bölgesinin temel işlevinin, transkripsiyon faktörünün DNA üzerindeki doğru yere sıkıca tutunmasını sağlamak olduğunu, aktivasyon bölgesinin ise, bağımsız olarak, protein-protein etkileşmeleri yoluyla transkripsiyonu uyardığını gösterir.

Günümüzde, ökaryot hücrelerde, kompleks çok hücreli organizmalardaki dokuya-özgü ve uyarılabilir gen ekspresyonunun karmaşıklığından bekleneceği gibi, birçok farklı transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Moleküler incelemeler, bu proteinlerden çoğunun DNA'ya-bağlanan bölgesinin diğer bir proteinle bağlantılı olduğunu, göstermiştir (Şekil 6.27). **Çinko parmak bölgeler**, çinko iyonlarını bağlayan sistein ve histidin amino asit tekrarlarına sahip, DNA'ya



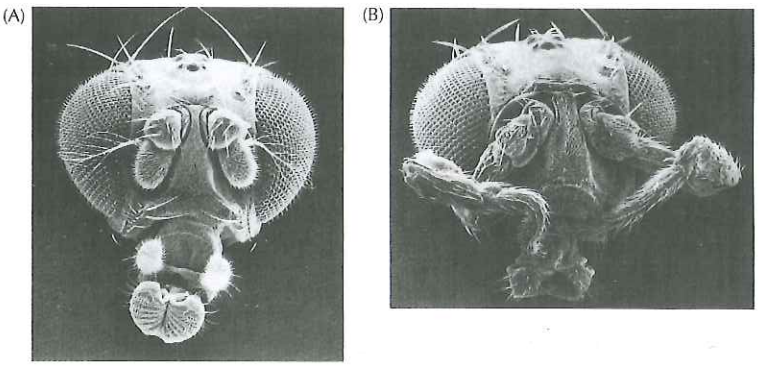
Şekil 6.26 Transkripsiyon aktivatörlerinin yapısı
Transkripsiyon aktivatörlerleri iki bağımsız bölgeden oluşur. DNA'ya-bağlanma bölgesi özgül DNA dizilerini tanır ve aktivasyon bölgesi ise, transkripsiyon mekanizmasının diğer bileşenleri ile etkileşir.



Şekil 6.27 DNA'ya bağlanan bölge türleri
(A) Çinko parmak bölgeleri, çinko iyonuna eşgüdümlü şekilde bağlı α sarmal ve β tabaka içeren ilmiklerden oluşur. (B) sarmal-dönüş-sarmal bölgeleri, üç (bazı durumlarda dört) sarmal bölgeden oluşur. Bir sarmal (sarmal 3) DNA ile esas teması kurarken, sarmal 1 ve 2 üstte uzanır ve bağlantıyı stabilize eder. (C) Lösin fermuar proteinlerinin DNA bağlanma bölgeleri, iki farklı polipeptid zincirinden oluşmuştur. Lösin amino asitlerinin, helikal bölgenin bir yanında (lösin fermuarı) yer alan, hidrofobik yan zincirleri dimerleşmeden sorumludur. Lösin fermuarını, DNA'ya bağlanan, bazik amino asitler içeren bir sarmal izler. (D) Sarmal-ilmik-sarmal bölgeler, dimerleşme bölgelerinden her birinin, bir ilmik ile ayrılmış iki helikal bölgeden oluşması dışında, lösin fermuarlara benzerler.

bağlanan bir ilmik yapısı ("parmak") oluşturan bölgelerdir. Bu bölgeler, ilk önce, polimeraz III transkripsiyon faktörü TFIIIA'da tanımlanmış ise de, Sp1'in de dahil olduğu, polimeraz II promotörlerini düzenleyen genel transkiripsiyon faktörlerinde de ortaktır. Çinko parmak bölgeler içeren diğer transkripsiyon faktörü örnekleri, östrojen ve testosteron gibi hormonlara yanıt olarak gen transkripisyonunu düzenleyen **steroid hormon reseptörleridir**.

Sarmal-dönüş-sarmal motifi, ilk kez, *E.coli* katabolit aktivatör proteinin de (CAP) dahil olduğu, prokaryot DNA'sına bağlanan proteinlerde görülmüştür. Bu proteinlerde, sarmallardan biri, DNA ile en yakın teması sağlarken, diğer sarmallar, komplekste bir yandan bir yana uzanarak etkileşimi sağlamlaştırır. Ökaryot hücrelerde, sarmal-dönüş-sarmal proteinler, embriyonik gelişim sırasında gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynayan **homeodomeyn** proteinleri de içerir. Bu proteinleri kodlayan genler, ilk önce, *Droshophila*'da gelişimsel mutantlar olarak bulunmuştur. İlk olarak tanınan *Droshophila* mutantlarının bazıları (1894'te homeotik mutantlar olarak adlandırıldı), sineklerin gelişiminde bir vücut parçasının bir diğer parçaya dönüşümüyle sonuçlanmaktaydı. Örneğin, *Antennapedia* olarak adlandırılan homeotik mutantta, sineğin başından, anten yerine bacaklar çıkar (Şekil 6.28). Ed Lewis tarafından 1940'da keşfedilen bu mutantların genetik analizi, *Droshophila*'nın, her biri farklı bir vücut segmentinin kimliğini belirleyen dokuz adet homeotik gen içerdiğini gösterdi. Bu genlerin klonlanması ve moleküler analizleri, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanan bölgelerini kodlayan 180 baz çiftlik, korunmuş diziler (**homeokutu** olarak adlandırılır) içerdiğini gösterdi. O zamandan beri, geniş çeşitlilikte ek homeodomeyn proteinleri, mantarlarda, bitkilerde ve

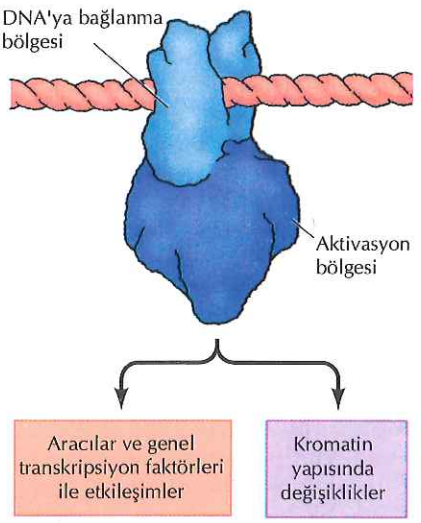


Şekil 6.28 Antennapedia mutasyonu
Antennapedia mutant sineklerin başlarında, anten yerine bacaklar gelişir. (A) Normal bir sinek başı. (B) *Antennapedia* mutantı sineğin başı. (F. Rudolf Turner'in katkısı, Indiana University)

insan da dahil olmak üzere diğer hayvanlarda tanımlandı. Omurgalıların homeokutu genleri, hem yapısal hem de fonksiyonel olarak *Droshophila*'daki eşdeğerlerine çarpıcı bir şekilde benzer. Bu benzerlik, bu transkripsiyon faktörlerinin hayvan gelişiminde çok iyi korunmuş rolleri olduğunu gösterir.

DNA'ya bağlanan protein ailelerinin diğer ikisi, **lösin fermuarı** ve **sarmal-ilmik-sarmal** proteinler, iki polipeptid zincirinin dimerleşmesiyle oluşan, DNA'ya bağlanan bölgeler içerirler. Lösin fermuarı, hidrofobik yan zincirleri helikal bölgenin bir yanında sergilenecek şekilde, yedi amino asit arayla yerleşmiş dört veya beş lösin içerir. Bu bölge, lösin yan zincirleri aralarındaki hidrofobik etkileşimle birarada tutulan iki protein alt birim için, dimerleşme bölgesi olarak iş görür. Lösin fermuarının hemen ardından, DNA'ya bağlanan, pozitif yüklü amino asitlerce (lizin ve arjinin) zengin bir bölge gelir. Sarmal-ilmik-sarmal proteinler de, her bir dimerleşme bölgesinin, bir ilmikle ayrılmış iki sarmal bölgeden oluşması dışında, benzer yapıdadırlar. Lösin fermuarı ve sarmal-ilmik-sarmal transkripsiyon faktörlerinin her ikisinin de önemli bir özelliği, bu ailelerin farklı üyelerinin bir diğeri ile dimer oluşturabilmesidir. Böylece, farklı protein alt birim bileşimleri, DNA dizisi tanıma ve transkripsiyon uyarıcı aktivite yönünden farklı, geniş çeşitlilikte faktörlerin oluşmasını sağlar. Hem lösin fermuarı hem de sarmal-ilmik-sarmal proteinler, dokuya-özgül ve uyarılabilir gen ekspresyonunda önemli rol oynar ve bu ailelerin farklı üyeleri arasındaki dimer oluşumu, fonksiyonlarının kontrolü için önem taşır.

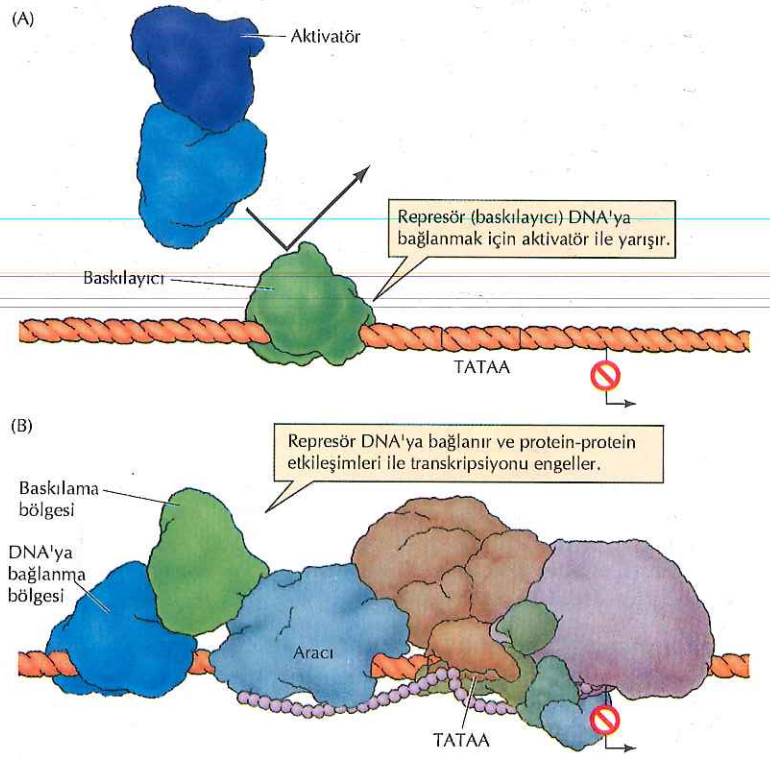
Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgeleri, DNA'ya bağlanan bölgeleri kadar iyi tanımlanmamıştır. Asidik aktivasyon bölgeleri adı alan bazıları, negatif yüklü amino asitlerce (aspartat ve glutamat) zenginken, diğerleri prolin veya glutamince zengindir. Ökaryot transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgeleri, transkripsiyonu iki farklı mekanizma ile uyarır (Şekil 6.29). Bunlardan ilkinde, bakterideki transkripsiyon aktivatörlerine benzer şekilde, RNA polimerazın bağlanması için, aracı proteinler ve TFIIB veya TFIID gibi genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerler ve transkripsiyon kopleksinin promotörde toplanmasını kolaylaştırırlar (bkz. Şekil 6.10). Bu bölümde daha sonra tartışılacağı üzere, ökaryot transkripsiyon faktörleri, ayrıca, kromatin yapıyı değiştirerek transkripsiyonu uyaran **koaktivatör** türleri ile de etkileşirler.



Şekil 6.29 Transkripsiyon aktivatörlerinin etki şekli
Ökaryotik aktivatörler, transkripsiyonu iki yolla uyarırlar. Transkripsiyon kompleksinin yapılanmasını kolaylaştırmak üzere aracı proteinlerle ve genel transkripsiyon faktörleri ile birleşerek ve kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonu sağlayan kofaktörlerle birleşerek.

Ökaryotik Represörler (Baskılayıcılar)

Ökaryot hücrelerde gen ekspresyonu, transkripsiyon aktivatörleriyle olduğu kadar, represörler ile de düzenlenir. Prokaryot eşdeğerleri gibi,



Şekil 6.30 Ökaryot represörlerinin işleyiş şekli
(A) Bazı represörler, aktivatörlerin regülatör dizilere bağlanmasını engeller. (B) Diğer represörler, gerek Aracı proteinler veya genel transkripsiyon faktörleri ile, gerekse kromatin yapılanmasını değiştiren korepresörlerle etkileşerek transkripsiyonu engelleyen aktif represör bölgeleri içerirler.

ökaryot represörler de, özgül DNA dizilerine bağlanarak, transkripsiyonu engellerler. Bazen, ökaryot represörleri, basitçe, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engeller (Şekil 6.30A). Örneğin, represörün, transkripsiyon başlangıç noktasının yakınına bağlanması, RNA polimerazın veya genel transkripsiyon faktörlerinin promotöre bağlanmasını engeller ki bu, represörlerin bakterideki davranışlarının benzeridir. Diğer represörler, spesifik regülatör dizilere bağlanmada aktivatörler ile yarışırlar. Bu gibi bazı represörler, aktivasyon bölgelerinin olmamasına karşın, aktivatördeki ile aynı, DNA'ya bağlanan bölgelere sahiptirler. Sonuç olarak, promotör veya güçlendiriciye bağlanmaları, aktivatörün bağlanmasını bloke ederek transkripsiyonu durdurur.

Basitçe aktivatör bağlanmasını engelleyen represörlerin aksine, bir çok represör (aktif represörler olarak adlandırılırlar), protein-protein etkileşimleri yoluyla transkripsiyonu inhibe eden, özgül fonksiyonel bölgeler içerirler (Şekil 6.30B). Bu tip ilk represör, *Drosophila*'nın embriyonik gelişiminde yer alan *Krüppel* isimli genin incelenmesi sırasında, 1990'da tanımlandı. Krüppel proteininin moleküler analizleri, proteinin, DNA'ya bağlanan çinko parmak bölgesine benzeyen, ayrı bir represör alanı içerdiğini gösterdi. Krüppel represör bölgesi, DNA'ya bağlanan diğer transkripsiyon faktörlerinin farklı bölgeleri ile değiştirilebiliyordu. Transkripsiyonu baskılayan bu hibrid moleküller, Krüppel baskılama bölgesinin, DNA'ya bağlanma

bölgesine bakmaksızın, protein-protein etkileşimi yoluyla transkripsiyonu engellediğini gösterdi.

Hayvan hücrelerinde transkripsiyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynadıkları anlaşılan bir çok aktif represör bulunmuştur, bunlar çoğu zaman, hücre çoğalması ve farklılaşmasında kritik düzenleyici görev üstlenirler. Transkripsiyon aktivatörlerinde olduğu gibi, çok sayıda farklı tipte baskılayıcı bölge tanımlanmıştır. Örneğin, Krüppel'in baskılayıcı bölgesi, alanince zengin iken, diğer baskılayıcı bölgeler prolin ve asidik amino asitler bakımından zengindir. Ayrıca, represörlerin fonksiyonel hedefleri çeşitlidir ve transkripsiyonu; özgül aktivatör proteinlerle, aracı proteinler veya genel transkripsiyon faktörleriyle ve kromatin yapıyı değiştiren **korepresörlerle** etkileşerek inhibe edebilirler.

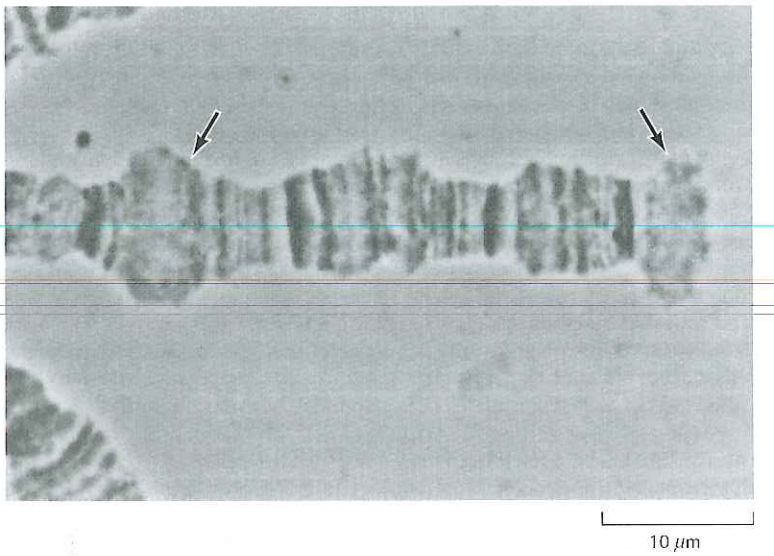
Transkripsiyonun, hem represörlerle hem de aktivatörlerle düzenlenmesi, ökaryot genlerinin ekspresyonlarını kontrol eden mekanizmaların etki sahasını önemli ölçüde genişletir. Uygun olmayan hücre tiplerinde dokuya-özgül genlerin ekspresyonun engellenmesi, represörlerin önemli bir görevi olabilir. Örneğin, daha önce kaydedildiği üzere, immünglobulin güçlendiricisindeki represör-bağlayıcı dizi, lenfoid haricindeki hücre tiplerinde transkripsiyonu baskılayarak, dokuya-özgül ekspresyona katkıda bulunur. Diğer represörler, hormonlara ve büyüme faktörlerine yanıtla ortaya çıkan hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolünde, anahtar rol oynarlar.

Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi

Önceki tartışmada belirtildiği gibi, aktivatör ve represörlerin ikisi de, ökaryotlarda transkripsiyonu, yalnız transkripsiyon sisteminin diğer bileşenleri ile etkileşerek değil, kromatin yapsındaki değişikliklerle de düzenlerler. Ökaryot hücre DNA'sı nükleus içerisinde çıplak DNA olarak bulunmaz, histonlarla sıkıca bağlıdır. Kromatinin temel yapısal birimi, nükleozomdur. Nükleozom, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer adet içeren molekülün etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA ile, nükleozom çekirdek partikülüne eklenen, DNA'ya bağlı bir histon H1 molekülünden oluşur (bkz. Şekil 4.12). Kromatin daha sonra, büyük DNA ilmikleri oluşturmak üzere, üst düzey dolanmalarla, daha ileri düzeyde yoğunlaşır. Ökaryotik DNA'nın kromatine paketlenmesi, transkripsiyon için kalıp olarak kullanılabilme koşullarını önemli ölçüde etkilediğinden, kromatin yapısı, ökaryot hücrelerde gen ekspresyonun önemli bir yönüdür.

Aktif olarak transkribe edilen genler, büyük olasılıkla, Bölüm 4'de anlatılan 30-nm kromatin iplik yapısındaki göreceli olarak daha az yoğun kromatinde bulunur (bkz. Şekil 4.13). Örneğin, *Drosophila*'nın politen kromozomlarının mikroskobik görüntülenmesi, RNA sentezinde aktif olarak çalışan genom bölgelerinin, az yoğun kromatin bölgeleri ile uyuştuğunu gösterdi (Şekil 6.31). Bununla birlikte, aktif olarak kopyalanan genler, nükleozomda paketlemiş olarak histonlara bağlı kaldığından, transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz, kromatin ile etkileşimde çıplak DNA'ya göre daha fazla problemle karşılaşırlar. DNA'nın, nükleozom çekirdek partükülü etrafında sıkıca dolanmış olması, hem transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmesini hem de RNA polimerazın kromatin kaplı kalıptan transkripsiyonunu etkilediği için, transkripsiyon için başlı başına önemli bir engelidir.

Histonların modifikasyonu, nükleozum yeniden düzenlenmeleri ve **HMGN proteini** olarak adlandırılan iki, histon olmayan kromozomal proteinin, aktif olarak transkribe olan genlerlerin nükleozomlarına

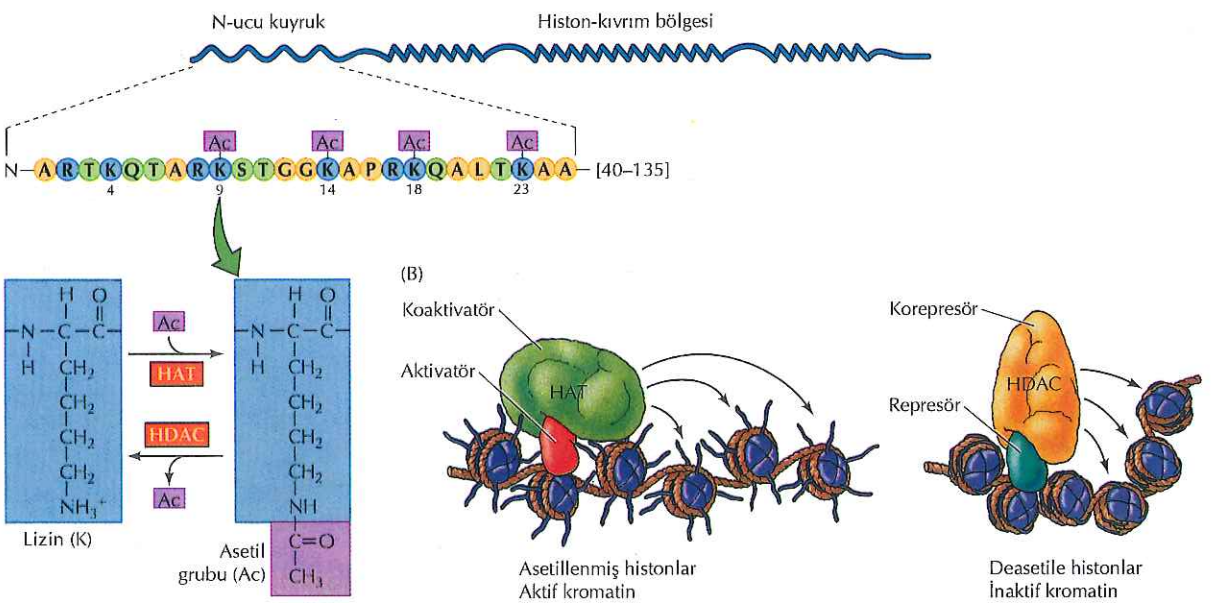


Şekil 6.31 *Drosophila*'da gevşek kromozom bölgeleri
Politen kromozomların, RNA sentezinde aktif olan, gevşek bölgelerini gösteren (oklar) ışık mikroskop görüntüsü. (Joseph Gall'ın katkısı, Carnegie Institute)

bağlanması gibi birkaç modifikasyon, transkripsiyonel aktif kromatinin özelliklerindendir. HMGN proteinlerin nükleozom üzerinde bulunan bağlanma yerleri, histon H1'in bağlanma yeri ile çakışıktır ve bu, HMGN proteinlerinin, dekondense kromatin yapısının devamı için, histon H1'in nükleozom ile etkileşimini bozarak, transkripsiyonu uyardıklarını gösterir.

Birçok hücre tipinde, **histon asetillenmesi**, transkripsiyonel olarak aktif kromatinle ilgilidir (Şekil 6.32). Çekirdek histonlar (H2A, H2B, H3 ve H4), iki işlevsel bölge içerirler; biri histon-kıvrım bölgesi olup, diğer histonlarla etkileşimde ve DNA'nın nükleozom çekirdek partikülünün çevresine dolanmasında görevlidir ve diğeri, amino-ucu kuyruk bölgesidir ve nükleozomdan dışarı uzar. Amino-ucu kuyruk bölgeleri, lizince zengindir ve özgün lizinlerin asetillenmesi ile değiştirilebilir. Asetillenme, histonların net pozitif yükünü azaltır ve hem DNA'ya bağlanmasını hem de diğer proteinlerle etkileşimini

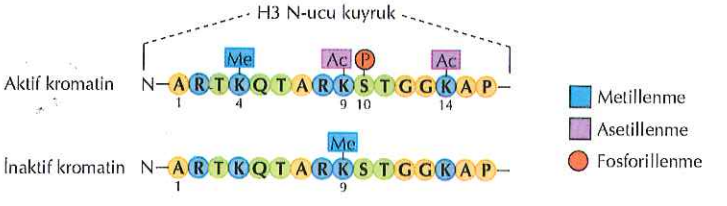
Şekil 6.32 Histon asetillenmesi
(A) Çekirdek histonların histon-kıvrım bölgeleri, diğer histonlar ve nükleozom DNA'sıyla etkileşim kurar, N-ucu kuyruk ise nükleozomun dışına uzar. Çekirdek histonların N-ucu kuyrukları (örn., H3), lizin birimlerinin yan zincirlerine asetil gruplarının (Ac) eklenmesiyle değiştirilir. (B)Transkripsiyon aktivatör ve represörleri, sırasıyla histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) aktivitelerine sahip koaktivatör ve korepresörlerle birleşirler. Histon asetillenmesi, aktif kromatinin özelliğidir ve histonların DNA'ya bağlanmasını zayıflatmakta ya da diğer proteinlerle etkileşimini değiştirmektedir.



zayıflatabilir. Ayrıca, histonların asetillenmesinin, nükleozomal DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir ve bu, histonların asetillenmesinin DNA'ya-bağlanan proteinlerin, kromatine ulaşılabilirliğini artırdığını göstermektedir.

İki grup araştırmacı tarafından 1996'da yapılan çalışmalar, transkripsiyon aktivatör ve represörlerinin sırayla histon asetiltransferaz ve deasetilaz ile bileştiğini göstererek, histon asetilasyonu ile transkripsiyonel regülasyon arasındaki doğrudan bağlantıyı, ortaya çıkardı. Bu bağlantı ilk defa, *Tetrahymena*'nın histon asetiltransferaz kodlayan geninin klonlanması sırasında ortaya çıkmıştır. Beklenmedik bir şekilde, bu histon asetiltransferazın dizisi, maya transkripsiyon kofaktörü olarak bilinen ve Gcn5p olarak adlandırılan genle yakından bağlantılıdır. Gcn5p, çok sayıda farklı diziye-özgül transkripsiyon aktivatörü ile birleşerek, transkripsiyonu uyarır. Daha sonraki çalışmalar, Gcn5p'nin kendisinin histon asetiltransferaz aktivitesi gösterdiğini açığa çıkardı ve bu, transkripsiyon aktivasyonunun, doğrudan histon asetilasyonundan kaynaklandığını gösterdi. Bu bulgular, histon asetiltransferazın, çok sayıda memeli transkripsiyon kofaktörüyle ve aynı zamanda genel transkripsiyon faktörü TFIID ile ilişkili olduğunun gösterilmesiyle genişletilmiştir. Bunun aksine, hem memeli hem mayalardaki bir çok transkripsiyon korepresörü, asetil grubu histon kuyruğundan ayıran histon deasetilaz işlevi görürler. Böylece, histon asetillenmesi, transkripsiyonel aktivatör ve represörler tarafından doğrudan hedeflenen, ökaryot gen ekspresyonunun anahtar regülatörü rolünü üstlenir.

Histonlar, sadece asetillenerek değil, serin birimlerinin fosfatlanması, lizin ve arjinin metillenmesi ve lizinlere ubükitin (Bölüm 7'de tartışılan küçük bir peptid) eklenmesiyle de modifiye olurlar. Asetilasyon gibi bu modifikasyonlar da, histon kuyruklarındaki spesifik amino asitlerde meydana gelir ve transkripsiyonel aktivitenin değişmesiyle ilişkilidir (Şekil 6.33). Spesifik histon modifikasyonlarının, kromatin yapısını etkilemesine ilaveten, diğer transkripsiyonel regülatör proteinlere bağlanma bölgesi oluşturarak gen ekspresyonunu etkilediği öne sürülmüştür. Bu hipoteze göre, özgül histon modifikasyonları bileşimi, diğer düzenleyici proteinleri kromatin kalıba getirerek, gen ekspresyonun düzenleyen bir "**histon kodu**" oluşturur. Örneğin, transkripsiyonel olarak aktif kromatin, histon H3'ün; lizin-4'ün metillenmesi, serin-10'un fosfatlanması ve lizin-9 ile lizin-14'ün asetillenmesini kapsayan, bazı özgül modifikasyonlar ile ilişkilidir. Buna karşın, lizin-9 metillenmesi, baskılanma ile ilişkilidir ve H3 lizin-9 metillenmesini katalizleyen enzim, korepresörler tarafından hedef genlere ulaştırılır. Metillenmiş H3 lizin-9 birimlerinin, histon modifikasyonu ile transkripsiyonun baskılanmasının doğrudan ilişkili olduğunun kanıtı olarak, kromatin kondasyonuna neden olan proteinler için bağlanma yeri görevi yaptığı da gösterilmiştir.

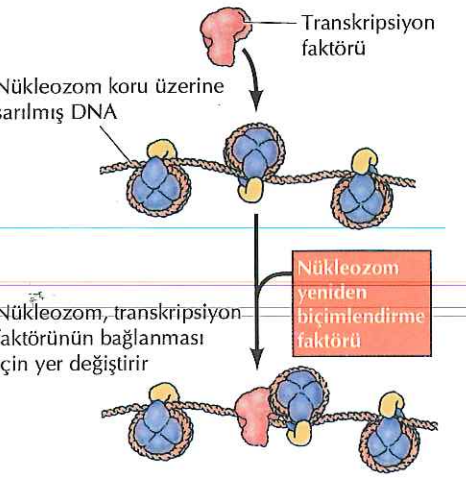


Şekil 6.33 Histon metillenmesi ve fosfatlanması
Kromatinin transkripsiyonel aktivitesi, histon kuyruklardaki özgül amino asitlerin asetillenmesi gibi, metillenmesi ve fosfatlanmasıyla da etkilenir. Örneğin, transkripsiyonel olarak aktif kromatin, H3 lizin-4 metillenmesi, serin-10 fosfatlanması ve lisin-9 ile lisin-14 asetillenmesi ile karakterizedir. Buna karşın, inaktif kromatin, H3 lizin-9 metillenmesi ile karakterizedir.

Histon kuyruklarındaki bu modifikasyonların, birbirlerini düzenleyerek, transkripsiyonel aktivite ile uyumlu, farklı histon modifikasyonu paternlerinin oluşumuna yol açmaları, dikkate değer bir noktadır. Örneğin, H3 serin-10 fosforilasyonu, lizin-14'ün asetillenmesini desteklerken, lizin-9'un metillenmesini engelleyerek, transkripsiyonel olarak aktif kromatinin karakteristiği olan H3 modifikasyon paterninin yapılanmasını sağlar. Lizin-4'ün metillenmesi, iki lizin biriminin metillenmesinin, transkripsiyonun baskılanması ya da aktivasyonu üzerindeki zıt etkileriyle uyumlu şekilde, aynı zamanda, lizin-9'un metillenmesini engeller ve bunun tersi de geçerlidir. Bu farklı monomerlerin modifikasyonları arasındaki karşılıklı etkileşim, kromatinin transkripsiyonel aktivitesi için kalıcı bir regülatör şifre sağlayacak bir histon modifikasyon deseni ile sonuçlanır.

Kromatin yapısını, histonları değiştirerek düzenleyen enzimlerin aksine, **nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri**, nükleozomların yapısını veya düzenlenimini, histonları uzaklaştırmadan veya kovalent olarak modifiye etmeden değiştiren, protein kompleksleridir (Şekil 6.34). Nükleozom yeniden biçimlendirme faktörlerinin etki mekanizmalarından biri, histon oktomerlerinin DNA molekülü üzerinde kaymasını katalizleyerek, nükleozomların yerleşimini değiştirmek ve böylece, transkripsiyon faktörlerinin DNA'nın spesifik dizilerine ulaşabilmesini sağlamaktır. Diğer taraftan, nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri, nükleozom konformasyonunun değişimine neden olarak da, spesifik DNA dizilerinin, transkripsiyonu düzenleyen proteinlerle etkileşmesini sağlayabilirler. Nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri, histon modifiye eden enzimlere benzer şekilde, transkripsiyon aktivatör veya represörleriyle birlikte DNA'ya bağlanıp nükleozom düzenini değiştirerek transkripsiyonu uyarabilir veya engelleyebilirler.

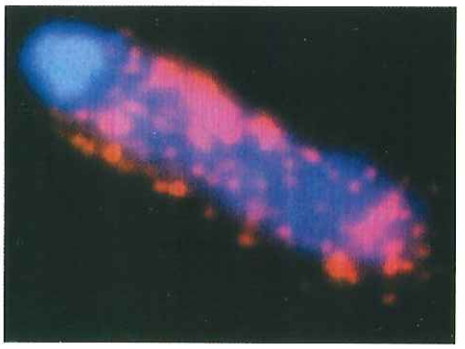
Histon modifiye eden enzimler ve nükleozom yeniden biçimlendirme faktörlerinin transkripsiyon aktivatörleriyle birlikte bağlanması, güçlendirici ve promotör bölgelerde kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonun başlamasını sağlar. Ancak, transkripsiyonun başlamasını takiben, RNA polimeraz, kromatin kalıp üzerinde transkripsiyonu sürdürebilme sorunu ile karşı karşıyadır. Şaşırtıcı olan, DNA'nın nükleozomlara paketlenmiş olmasının, RNA polimeraza geçit vermez bir engel oluşturmaması ve histon-DNA bağlantılarını açarak nükleozom çekirdeği üzerinden transkripsiyonu sürdürebilmesidir. RNA polimerazın kromatin kalıbı transkribe edebilmesi, hem HMGN proteinlerin aktif olarak kopyalanan genlerin nükleozomları ile birleşmesi, hem de, transkripsiyon başladığı zaman RNA polimeraz II'nin fosfatlanmış C-ucuna bağlanan **uzama faktörleri** ile kolaylaştırılır (bkz. Şekil 6.14). Bu uzama faktörleri, transkripsiyon sırasında nükleozom yapısının bozulmasını doğrudan etkiledikleri gibi, histon asetiltransferazların bağlanmasını da sağlarlar.



Şekil 6.34 Nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri
Nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri, nükleozom yapısını veya düzenini değiştirirler. Örneğin, bir nükleozom yeniden biçimlendirme faktörü, nükleozomların DNA üzerindeki konumlarını değiştirirek, transkripsiyon faktörlerinin kromatine bağlanmasını kolaylaştırabilir.

Transkripsiyonun Kodlanmayan RNA'lar ile Düzenlenmesi

Son zamanlardaki bir dizi gelişme, gen ekspresyonunun sadece, şu ana kadar tartıştığımız transkripsiyon düzenleyici proteinler tarafından değil, kodlamayan RNA molekülleri ile de düzenlenebildiğini gösterdi. Kodlamayan düzenleyici RNA'ların etkinliklerinden biri, RNA interferansı ile translasyonu engellemektir; kısa çift-iplikli RNA'ların homolog mRNA'ların yıkımına neden olduğu bir durumdur (bkz. Şekil 3.41). Buna ek olarak, kodlamayan RNA'ların bazı



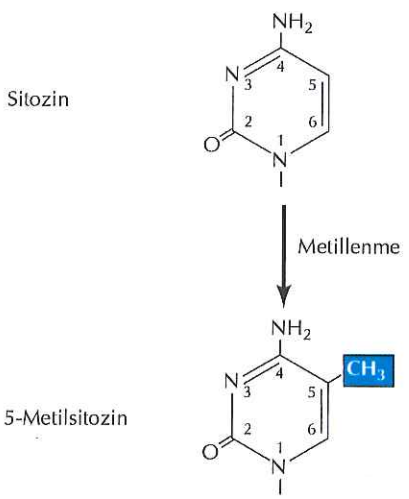
Şekil 6.35 X kromozomu inaktivasyonu
Xist RNA (kırmızı) ile kaplanmış inaktif X kromozomu (mavi). (B. Panning ve R. Jaenisch, 1998. *Cell* 93: 305'den.)

kromozom bölgelerinde, kromatin yoğunlaşmasına ve heterokromatin oluşumuna öncülük eden bir histon modifikasyonuna neden olarak, transkripsiyonun baskılanmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. Çalışma mekanizmalarına dair öğreneceğimiz çok şey olmasına rağmen, kodlamayan RNA'lar, ökaryot hücrelerde, kromatin yapısının ve işlevinin düzenlenmesinde, açıkça önemli roller oynamaktadırlar.

X kromozomu inaktivasyonu fenomeni, kodlamayan RNA'ların memelilerdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde oynadıklara role bir örnektir. İnsan da dahil olmak üzere pek çok hayvanda, dişilerde iki adet X kromozomu, erkeklerde ise bir adet X bir adet Y kromozomu bulunur. X kromozomu, daha küçük olan Y kromozomunda bulunmayan yüzlerce gen, içerir (bkz. Şekil 4.29). Bu nedenle dişiler, X kromozomundaki genlerin çoğu için, erkeklere kıyasla iki kat daha fazla kopyaya sahiptir. Bu farklılığa rağmen, dişi ve erkek hücreleri, X kromozomu genlerinin büyük bir bölümünden kodlanan proteinleri, eşit miktarda içerir. Bu, dozaj ayarlama mekanizmasının bir sonucudur ve dişi hücrelerindeki iki X kromozomunun bir tanesinin üzerindeki genlerin çoğunun, gelişimin erken dönemlerinde, heterokromatine dönüşerek aktivite kaybetmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, hem dişilerde hem de erkek hücelerinde, X kromozomunda yerleşmiş genlerin önemli kısmında sadece kopyalardan biri transkripsiyon için uygundur.

X kromozomunun inaktivasyon mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, inaktif X kromozomu üzerinde bulunan ve *Xist* olarak adlandırılan regülatör bir genden kopyalanan, kodlamayan bir RNA, anahtar eleman olarak görülmektedir. *Xist* RNA, bağlanıp kaplayarak inaktif X üzerinde yerleşik kalır (Şekil 6.35). Ek olarak, *Xist* RNA'sı, inaktif X'in üzerinde bulunan pek çok genin transkripsiyonunu baskılayan regülatör proteinlerin bağlanmasını kolaylaştırır. Bu proteinlerin henüz tanımlanmamış olmasına karşın, *Xist* RNA'nın temel etkisinin, histon H3 lizin-9'un metillenmesini uyararak, kromatin yoğunlaşmasına ve inaktif X'in heterokromatine dönüşümününe öncülük ettiği anlaşılmıştır.

Son zamanlarda, kodlamayan RNA'ların, bölünen maya *Schizosaccharomyces pombe*'nin sentromerinde heterokromatinin oluşumunda ve transkripsiyonel sessizleştirmede, anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir. Bu durumda, tekrarlayan sentromerik DNA dizilerine homolog RNA'lar, transkripsiyonu baskılar ve sentromerde heterokromatin oluşumuna neden olur. X kromozomu inaktivasyonunda olduğu gibi, histon H3 lizin-9'un metillenmesi, maya sentromerinde heterokromatin oluşumunun başlangıç aşamasıdır. İlginç olan, *S. pombe*'deki düzenleyici sentromerik RNA'ların etkinliğinin, mRNA'larının yıkımını hedefleyerek gen ekspresyonunu durduran, küçük engelleyici RNA'ların oluşumundan sorumlu hücresel sistem tarafından küçük, çift-iplikli RNA'lara dönüştürülmelerine bağlı olmasıdır.



Şekil 6.36 DNA metillenmesi
DNA'daki sitozin birimlerinin 5-karbon pozisyonlarına metil grubu eklenir.

DNA Metillenmesi

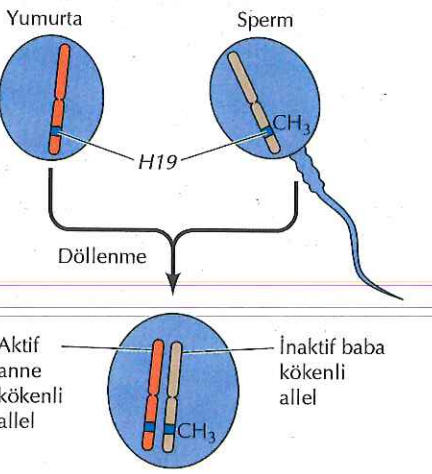
DNA'nın metillenmesi, omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili diğer bir genel mekanizmadır. Omurgalı DNA'sındaki sitozin birimleri, 5-karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilebilir (Şekil 6.36). DNA, zincirinde G'lerden önce yer alan C'lerden (CpG dinükleotidler) spesifik olarak metillenir. Bu metillenme, promotörlerin çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir. Metillenme, bu genlerin transkripsiyonunu,

hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek, hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak, engeller. Metillenen DNA'ya bağlanan represörler, histon deasetilazlar ile kompleks oluşturarak çalışır ve DNA metillenmesini, histon asetilasyonu ve nükleozom yapısındaki değişimlerle ilişkilendirir.

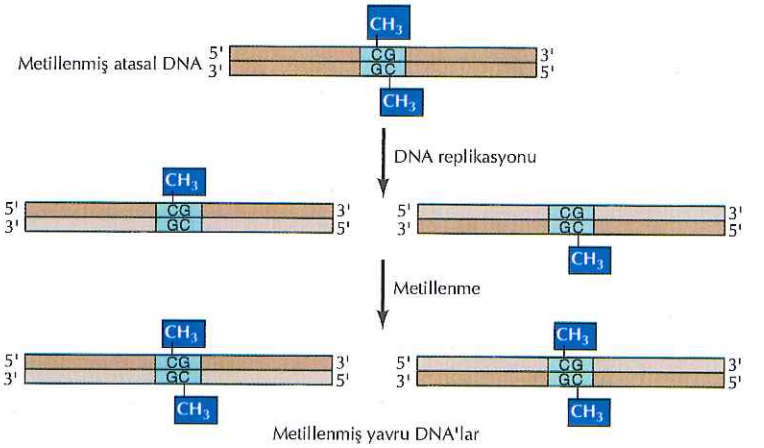
DNA metillenmesi transkripsiyonu engelleyebilmesine karşın, genellikle, önceden baskılanmış olan genlerin metillendiği görülür. DNA metillenmesi, transkripsiyon inaktivasyonun primer nedeni olmaktan çok, temel olarak gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliğinde ve korunmasında katkı sağlar. Örneğin, inaktif X kromozomu üzerindeki genler, DNA metillenmesinden sorumlu enzimleri inaktif genlere hedefleyen *Xist* RNA'sı ve histon H3 lizin-9'un metillenmesiyle transkripsiyonun baskılanmasını takiben, metillenirler. Bitkilerde, kodlamayan RNA'ların baskılanmış genlere DNA metilasyonunu hedeflediği de öngörülmektedir.

DNA metillenmesinin önemli bir regülatör rolü, memeli embriyosunun gelişiminde yer alan bazı genlerin ekspresyonunu denetleyen ve **genomik damgalanma** olarak bilinen fenomende tanımlanmıştır. Diploid hücrelerde, genellikle, bir genin hem anne kökenli (maternal) hem de baba kökenli (paternal) allelleri eksprese olur. Bununla birlikte, ekspresyonları anneden veya babadan kalıtılmalarına bağlı olan, bir kaç damgalanmış gen (fare ve insanda iki düzineden fazla tanımlanmıştır) vardır. Bazı durumlarda, damgalanmış genin sadece baba kökenli alleli eksprese olur ve anne kökenli allel inaktifir. Damgalanmış diğer bazı genlerde, anne kökenli allel eksprese olurken, baba kökenli allel inaktiftir.

DNA metillenmesi, damgalanmış genlerin anne kökenli ve baba kökenli allelleri arasındaki ayırımda, anahtar rolü oynar. Yalnız anne kökenli kopyası aktif olan *H19* geni buna iyi bir örnektir (Şekil 6.37). *H19* geni, erkeğin germ hücrelerinin gelişimi sırasında spesifik olarak metillenirken, dişininkinde metillenmez. Bu nedenle, döllenme ile yumurta ve spermin birleşmesi, genin metillenmiş olduğu baba kökenli allele ve metillenmemiş anne kökenli allele sahip bir embrio ürünü verir. Metillenme paternindeki bu farklılık, DNA replikasyonunu takiben, metillenmiş atasal ipliğe hidrojen-bağları ile bağlanmış yeni sentezlenen iplikteki CpG dizilerini özgül olarak metilleyen bir enzim sayesinde korunur (Şekil 6.38). Baba kökenli *H19* alleli, bu sayede metillenmiş olarak kalır ve embriyo hücrelerinde ve somatik dokularda transkripsiyonel olarak inaktiftir. Ancak, baba kökenli *H19* alleli, germ hattında demetile olur ve gelecek kuşağa aktarımda, yeni metillenme paterninin oluşturulmasına olanak verir.



Şekil 6.37 Genomik damgalanma
H19 geni, erkek germ hücrelerinin gelişimi sırasında özgül olarak metillenir. Bu yüzden, sperm, metillenmiş bir *H19* alleli ve yumurta metillenmemiş bir allel içerir. Döllenmeyi takiben, metilli baba kökenli allel transkripsiyonel olarak inaktif kalır ve embriyoda, sadece metillenmemiş anne kökenli allel eksprese edilir.



Şekil 6.38 Metillenme paternlerinin korunumu
Atasal DNA'da, her iki iplik, komplementer CpG dizilerinden metillenmiştir. Replikasyonu takiben, her yeni molekülde sadece atasal iplik metillidir. Yeni sentezlenen yavru iplikler, bir metillenme bölgesinin karşısındaki CpG dizilerini özgül olarak tanıyan bir enzim tarafından metillenir.

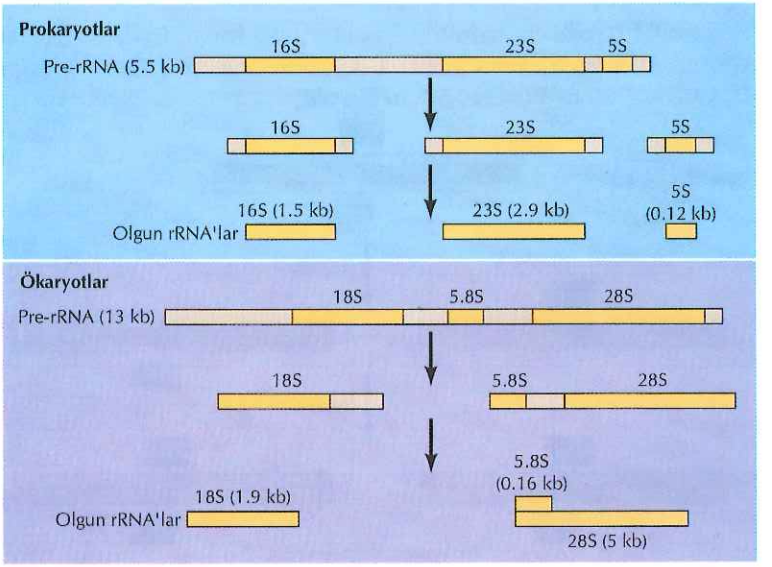
RNA İşlenmesi ve Dönüşümü

Gen ekspresyonunda transkripsiyon ilk ve en yaygın şekilde denetlenen basamak olmakla birlikte, genellikle, fonksiyonel bir RNA meydana getirmek için gerekli bir seri olayın sadece başlangıcıdır. Yeni sentezlenen RNA'ların, çoğu, işlevsel forma dönüştürülmek için faklı yollarla değiştirilmektedir. Bakteri mRNA'ları bir istisnadır; transkripsiyon sırasında, eş zamanlı olarak, protein sentezi için kullanılırlar. Fakat, hem rRNA hem de tRNA'lar, ökaryot hücrelerde olduğu gibi prokaryotlarda da bir dizi işlenme basamağından geçmelidir. Benzer bir şekilde, ökaryot mRNA'larının primer transkriptleri, çekirdekten protein sentezinde kalıp olarak görev yaptıkları sitoplazmaya taşınmalarından önce, kesilip-eklenme ile intronların çıkarılmasını içeren, kapsamlı bir değişikliğe uğrarlar. Bu işlenme basamaklarının denetlenmesi, farklı mRNA'ların hücre içerisinde daha sonraki yıkım hızlarının denetlenmesi ile de olduğu gibi, gen ekspresyonunun kontrolunda ek bir aşama oluşturur.

Ribozomal ve Taşıyıcı RNA'ların İşlenmesi

Prokaryot ve ökaryot hücrelerde ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesi, bu RNA'ların protein sentezindeki temel rollerinden de anlaşılacağı üzere, esas olarak benzerdir. Önceden tartışıldığı gibi, ökaryotlar dört tür ribozomal RNA'ya sahiptir (bkz. Tablo 6.1); bunlardan üçü (28S, 18S ve 5.8S rRNA'lar), **pre-rRNA** adı verilen tek ve uzun bir öncül transkriptin kesimiyle meydana gelir (Şekil 6.39). Prokaryotlar, ökaryot hücrelerin 28S, 18S ve 5S rRNA'larına eşdeğer olan üç ribozomal RNA'ya (23S, 16S ve 5S) sahiptir ve bunlar da tek bir pre-rRNA transkriptinin işlenmesi ile oluşturulur. Büyük ölçüde işlenmeyen tek rRNA, ayrı bir genden kopyalanan, ökaryotlardaki 5S rRNA'dır.

Prokaryot ve ökaryot pre-rRNA'ları, birçok basamakta işlemlenir. Bakteri pre-rRNA'sının başlangıç kesimleri, üç özel rRNA için ayrı öncüller oluşturur; bunlar daha sonra ikincil kesimlerle son ürünlere dönüştürülür. Ökaryot hücrelerde, pre-rRNA önce, 5'ucundaki 5.8S rRNA'ya bitişik bir bölgeden kesilerek; sırasıyla 18S ve 28S + 5.8S rRNA içeren iki farklı öncül ürün verir. Daha ileri kesimler bunları,

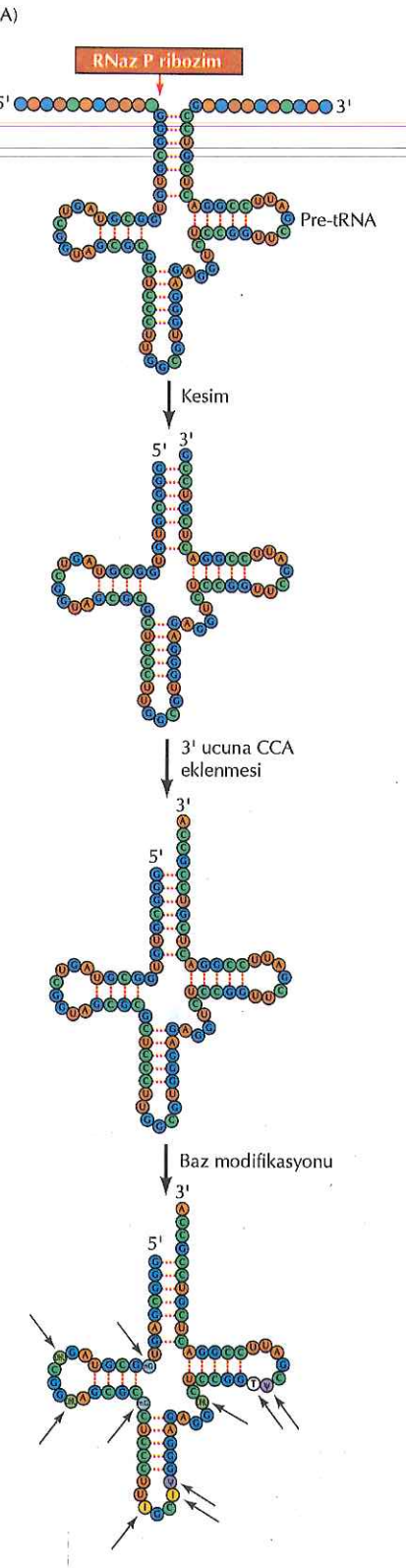


Şekil 6.39 Ribozomal RNA'ların işlenmesi
Prokaryot hücreler, bir pre-rRNA transkriptinin kesimi ile oluşan üç rRNA (16S, 23S, 5S) içerirler. Ökaryot hücreler (örn., insan hücreleri) dört rRNA'ya sahiptir. Bunlardan biri (5S rRNA), ayrı bir genden kopyalanır; diğer üçü (18S, 28S ve 5.8S) ortak bir pre-rRNA'dan oluşur. Kesimi takiben, 5.8S rRNA (ökaryotlara özel), 28S rRNA'ya hidrojen bağıyla bağlanır.

son ürünlerine dönüştürür ve 5.8S rRNA, 28S molekülüne hidrojen bağı ile bağlanır. Bu kesimlere ek olarak, rRNA işlenmesi, özgül bazı nükleotidlerin bazlarına ve şeker gruplarına, metil gruplarının eklenmesini de kapsar. Ribozomal RNA işlenmesi ökaryot hücrelerin nükleolusunda (çekirdekçiğinde) yer alır ve Bölüm 8'de ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

Ribozomal RNA'larda olduğu gibi, bakteri ve ökaryotlardaki tRNA'lar da, bazıları birkaç özel tRNA dizisi içeren, daha uzun öncül moleküller (**pre-tRNA'lar**) olarak sentezlenirler (Şekil 6.40). Bakterilerde, bazı tRNA'lar, pre-rRNA transkriptleri içinde yer alır. Pre-tRNA'nın 5' ucunun işlenmesi, **RNaz P** adı verilen bir enzim ile kesimi gerektirir ve bu, bir RNA enzim tarafından katalizlenen prototip bir reaksiyon modeli olduğu için, özel bir ilgi alanı oluşturmaktadır. RNaz P, her ikisi de maksimal aktivite için gerekli olan RNA ve protein moleküllerinden oluşur. Sidney Altman ve arkadaşları 1983'de, RNaz P'nin izole RNA bileşeninin, pre-tRNA kesimini kendi başına katalizleyebildiğini göstermişlerdir. Bu deneyler, RNaz P'nin bir **ribozim** - katalitik aktivitesinden proteinin değil RNA'nın sorumlu olduğu bir enzim olduğunu ortaya koymuştur.

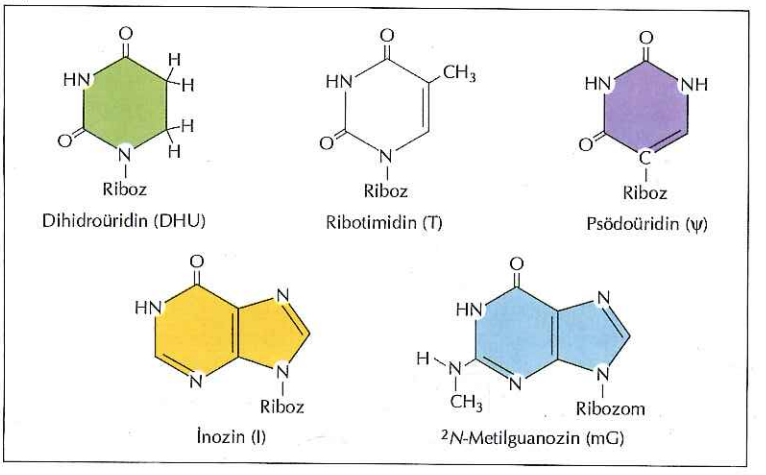
Taşıyıcı RNA'nın 3'ucu, geleneksel bir protein RNaz tarafından oluşturulur, ancak, tRNA molekülünün bu ucunun işlenmesi alışılmadık bir aktiviteyi içerir: bir CCA ucunun eklenmesi. Tüm tRNA'lar, 3'uçlarında CCA dizinine sahiptir. Bu dizin, amino asit tutunma bölgesi olduğundan, protein sentezi esnasında tRNA işlevselliği için gereklidir. Bazı tRNA genlerinin DNA'sında CCA ucu kodlanmış, bazılarında kodlanmamıştır. Kodlanmayanlarda, bu dizini içermeyen tüm tRNA'ların 3'ucunu tanıyıp CCA ekleyen bir enzim ile RNA işlenme aşamasında eklenir.



Şekil 6.40 Taşıyıcı RNA'ların işlenmesi

(A) Taşıyıcı RNA'lar, bazıları birkaç tRNA molekülü içeren pre-tRNA'lardan türetilir. Taşıyıcı RNA'nın 5' ucundaki kesim, RNaz P ribozimi tarafından katalizlenir; 3'ucundaki kesim bir geleneksel protein olan RNaz ile katalizlenir. Daha sonra, transkripsiyon sonrası işlenme basamağında, çoğu tRNA'nın 3' ucuna, bir CCA dizini eklenir. Son olarak, tRNA molekülünde karakteristik pozisyonlardaki bazı bazlar, modifiye edilir. Bu örnekteki değiştirilmiş nükleozitler; dihidroüridin (DHU), metilguanozin (mG), inozin (I), ribotimidin (T) ve psödoüridin (ψ)'dir. (B) Türev bazların yapısı. Ribotimidin, dihidroüridin ve psödoüridin, tRNA'daki üridinlerin modifikasyonu ile oluşturulur. İnozin ve metilguanozin ise, guanozinlerin modifikasyonu ile oluşturulur.

(B) Türev bazlar

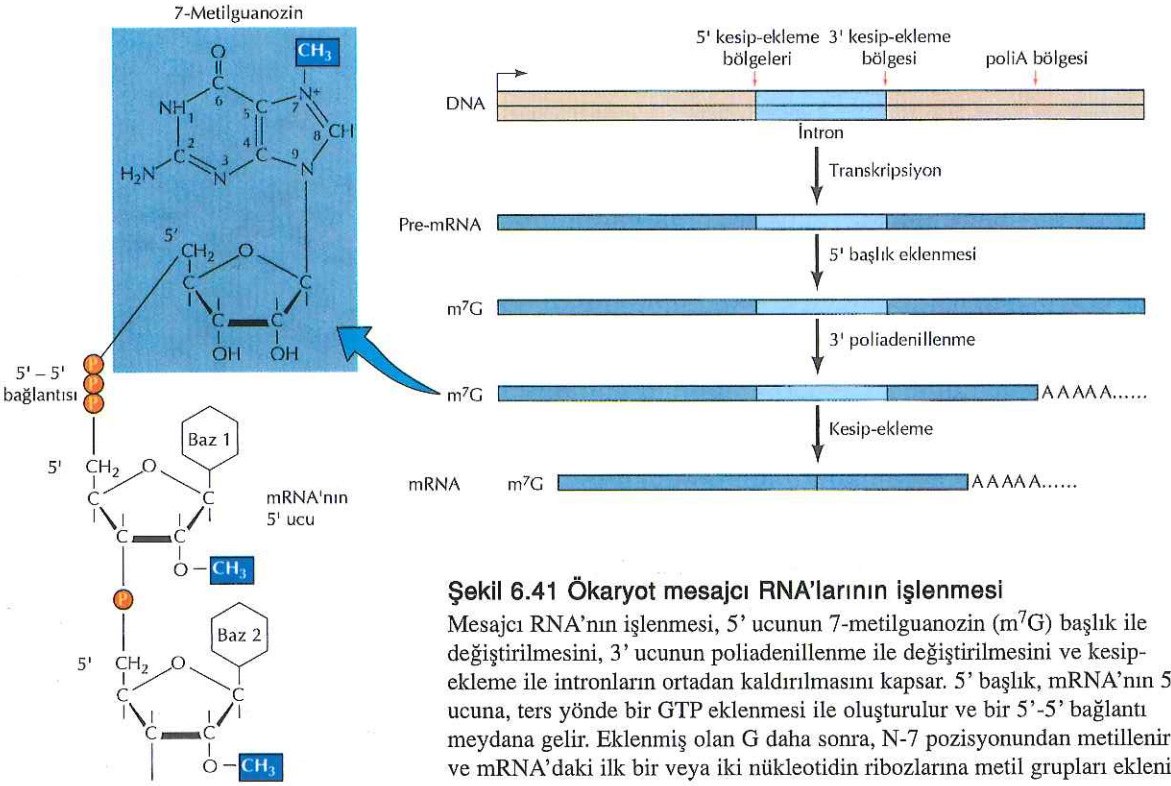


Taşıyıcı RNA işlenmesinin alışılmadık diğer bir yönü, tRNA moleküllerindeki bazların ileri modifikasyonudur. Taşıyıcı RNA'lardaki bazların yaklaşık %10'u değiştirilerek, tRNA moleküllerinde spesifik pozisyonlardaki çeşitli türev nükleotidler meydana getirilir (bkz. Şekil 6.40). Bu türev bazların çoğunun işlevi bilinmemektedir, fakat bazıları, tRNA molekülünün baz eşleşmesi özelliklerini değiştirerek, protein sentezinde önemli roller oynarlar (bkz. Bölüm 7).

Birkaç canlıda, pre-rRNA'larda olduğu gibi, bazı pre-tRNA'lar, kesip-ekleme ile ortadan kaldırılan intronlar içerirler. Katalitik RNA'ların aktivitelerini içeren diğer kesip-ekleme reaksiyonlarının aksine (sonraki kısımda tartışıldığı gibi), tRNA kesilip-eklenmesi, geleneksel protein enzimlerle gerçekleşir. Pre-tRNA, kesim bölgelerinden intronu çıkarmak için bir endonükleaz ile kesildikten sonra, olgun tRNA molekülünü oluşturmak üzere, eksonlar birleştirilir.

Ökaryotlarda mRNA'nın İşlenmesi

Ribozomal ve taşıyıcı RNA'ların işlenmesinden farklı olarak, mesajcı RNA'nın işlenmesi, prokaryot ve ökaryot hücreler arasında büyük bir farklılık gösterir. Bakterilerde, ribozomlar hemen mRNA üzerine yerleşir ve transkripsiyon sürerken yeni sentezlenen mRNA zinciri üzerinde çevrim başlar. Ökaryotlarda, çekirdekte sentezlenen mRNA, protein sentezi için kalıp olarak kullanılabilmesi için, önce sitoplazmaya taşınmalıdır. Ayrıca, ökaryot hücrelerde transkripsiyonun ilk ürünleri (**pre-mRNA'lar**), nükleustan ayrılmadan önce, ileri düzeyde değişime uğrar. Mesajcı RNA'ların işlenmesi, başlangıç transkriptinin her iki ucunun modifikasyonunun yanı sıra, ortasından intronların çıkarılmasını kapsar (Şekil 6.41). Bu işlenme reaksiyonları,



Şekil 6.41 Ökaryot mesajcı RNA'larının işlenmesi

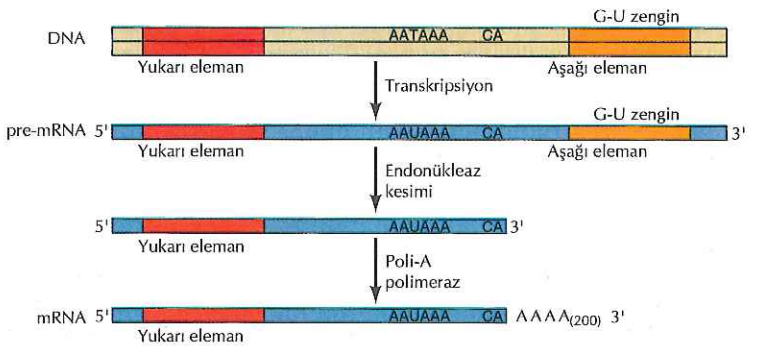
Mesajcı RNA'nın işlenmesi, 5' ucunun 7-metilguanozin (m^7G) başlık ile değiştirilmesini, 3' ucunun poliadenillenme ile değiştirilmesini ve kesip-ekleme ile intronların ortadan kaldırılmasını kapsar. 5' başlık, mRNA'nın 5' ucuna, ters yönde bir GTP eklenmesi ile oluşturulur ve bir 5'-5' bağlantı meydana gelir. Eklenmiş olan G daha sonra, N-7 pozisyonundan metillenir ve mRNA'daki ilk bir veya iki nükleotidin ribozlarına metil grupları eklenir.

bir pre-mRNA'nın sentezini izleyen bağımsız olaylar olmaktan ziyade, transkripsiyonla eşleşmişlerdir. Sonuç olarak, mRNA sentezi ve işlenmesi, gen ekspresyonunda sıkı bir şekilde koordine edilen basamaklardır. RNA polimeraz II'nin C ucu bölgesi (CTD)', mRNA işlenmesinde yer alan enzim kompleksleri için bağlanma bölgesi görevi görerek, bu işlenmeleri düzenlemede anahtar bir rol oynar. Bu işlemleme enzimlerinin, polimeraz II'nin CTD'siyle birleşmeleri, mRNA işlenmesindeki özgüllüklerini sağlar; polimeraz I ve III bir CTD'den yoksundur ve bu sebeple transkriptleri, aynı enzim kompleksleri tarafından işlenmez.

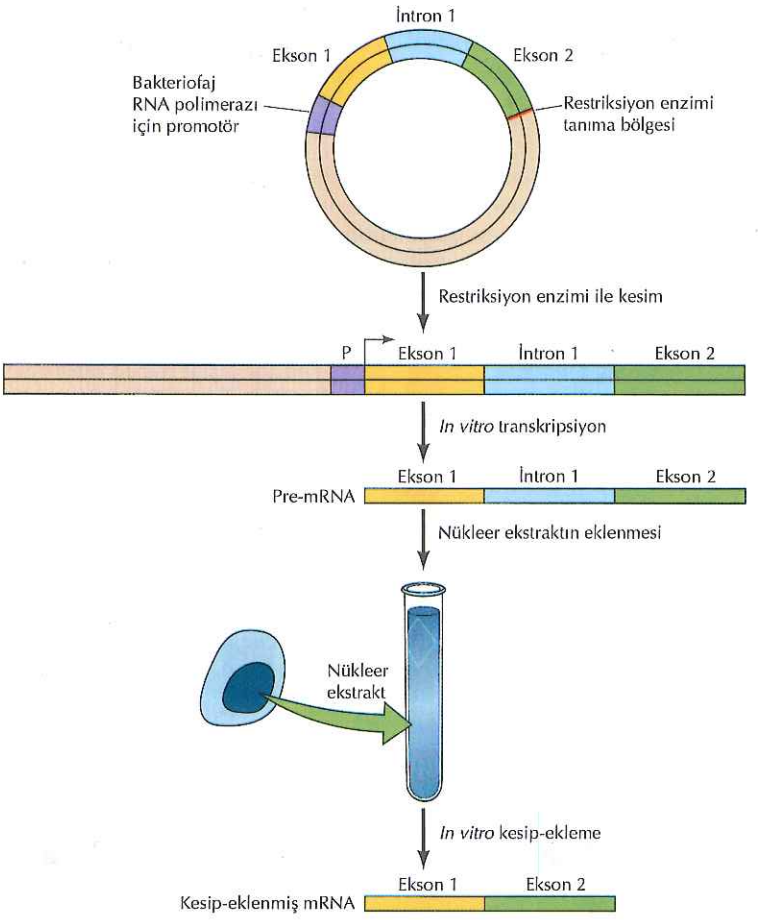
Mesajcı RNA işlenmesinde ilk basamak, transkriptin 5' ucunun, **7-metilguanozin başlık** adı verilen bir yapının eklenmesiyle, modifikasyonudur. Başlıklamadan sorumlu enzimler, transkripsiyonun başlamasını takiben, fosfatlanmış CTD'e bağlanır ve RNA'nın ilk 20-30 nükleotidinin transkripsiyonundan sonra başlık eklenir. Başlıklanma, RNA'nın 5' ucu nükleotidine ters yönlenimde bir GTP'nin eklenmesi ile başlatılır. Daha sonra bu G nükleotide ve RNA zincirindeki bir veya iki 5'nükleotidinin riboz gruplarına, metil grupları eklenir. 5' Başlık mRNA'yı koruduğu gibi, proteine çevrim esnasında ökaryot mRNA'larını ribozoma yerleştirir (bkz. Bölüm 7).

Çoğu ökaryot mRNA'sının 3' ucu, transkripsiyon ile değil, primer transkriptin kesilmesi ve bir **poli-A kuyruğunun** eklenmesi - **poliadenillenme** adı verilen bir işlenme reaksiyonu ile tanımlanır (Şekil 6.42). Poliadenillenme sinyalleri, poliadenillenme bölgesinin aşağısında G-U dan zengin bir dizi elemanı ile, yukarısında bulunan yüksek derecede korunmuş bir heksanükleotid (memeli hücrelerinde AAUAAA) dir. Buna ek olarak, bazı genler AAUAAA'nın yukarısında, U'dan zengin bir dizi elemanına sahiptir. Bu diziler; RNA zincirini kesen bir endonükleaz ile, transkripte takriben 200 nükleotidlik poli-A kuyruğu ekleyen ayrı bir poli-A polimeraz içeren, protein kompleksleri tarafından tanınır. Bu işleme enzimleri, RNA polimeraz II'nin fosforile CTD'i ile ilişkilidir ve polimeraz ile birlikte, transkripsiyon başlangıç bölgesinden itibaren tüm yolu katedebilirler. Kesim ve poliadenillenme, transkripsiyonun sonlanma sinyalini oluşturur ve bu, genellikle, poli-A eklenme bölgesinin yüzlerce nükleotid aşağısında gerçekleşir.

Ökaryotlardaki mRNA'ların hemen hepsi, poliadenillenmiştir ve poli-A kuyruklarının, hem proteine çevrimi hem de mRNA kararlılığını düzenlediği gösterilmiştir. Buna ek olarak, poli-A kuyruk uzunluğunun mRNA çevrimini denetlediği erken gelişimde, poliadenillenme, önemli bir düzenleyici rol oynar. Örneğin, döllenmemiş yumurta içerisinde, kısa poli-A kuyruklu birçok mRNA



Şekil 6.42 Ökaryot mRNA'ların 3' uçlarının oluşumu
Memeli hücrelerindeki poliadenillenme sinyalleri, yukarı ve aşağı (G-U zengin) elemanlara ek olarak, heksanükleotid AAUAAA'dan oluşur. Bir endonükleaz, pre-mRNA'yı AAUAAA'nın 10-30 nükleotid aşağısından, genellikle bir CA dizininden, keser. Daha sonra poli-A polimeraz, yaklaşık 200 A içeren poli-A kuyruğunu, RNA'nın 3' ucuna ekler.



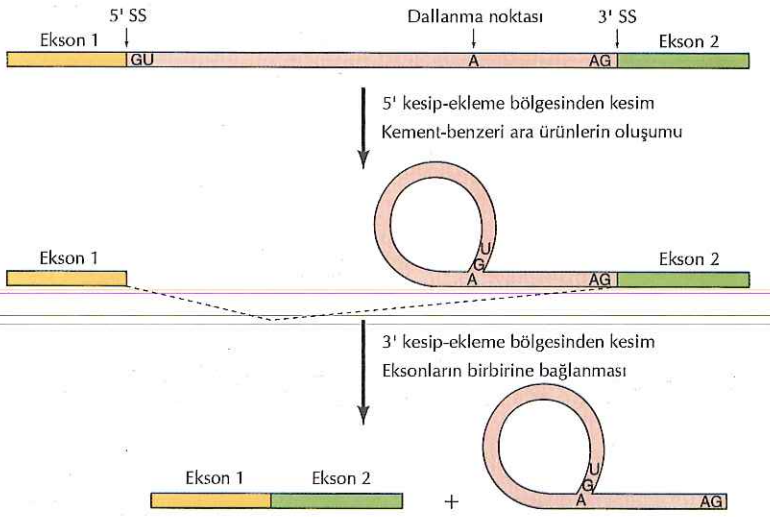
Şekil 6.43 *In vitro* kesip-ekleme
İntron içeren bir gen, bir bakteriofaj RNA polimerazı tarafından tanınan promotörün (P) aşağısına klonlanır. Plazmid, eklenmiş genin 3' ucundan kesim yapan bir restriksiyon enzimi ile kesilerek, doğrusal bir DNA molekülü oluşturulur. Daha sonra, bu DNA, bakteriofaj polimerazı ile in vitro kopyalanarak, pre-mRNA üretilir. Bu pre-mRNA, memeli hücrelerinin nükleer ekstraktlarına eklenerek, kesip-ekleme reaksiyonları *in vitro* olarak çalışılabilir.

(genellikle 30-50 nükleotid uzunlukta) proteine çevrilmeden, saklanır. Döllenme, depolanmış mRNA'ların poli-A kuyruklarının uzamasını uyararak, çevrimi ve erken embriyonik gelişim için gerekli proteinlerin sentezini aktive eder.

Pre-mRNA'ların en dikkat çekici modifikasyonu, kesip-ekleme ile intronların çıkartılmasıdır. Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, çoğu ökaryot genlerin kodlayıcı dizileri, olgun mRNA'dan doğru bir şekilde çıkartılan, kodlamayan dizilerle (intronlar) bölünmüştür. Memelilerdeki genlerin çoğu çok sayıda intron içerir ve bu, eksonların oluşturduğundan yaklaşık on kat daha büyük pre-mRNA dizisine tekabül eder. İntronların 1977 yılındaki beklenmeyen keşfi, işlevsel mRNA ürününün ortaya çıkması için, yüksek derecede hassas olması gereken kesip-ekleme mekanizmasını anlamaya yönelik, aktif araştırma çabalarını doğurmuştur. Kesip-ekleme üzerinde ileri çalışmalar, yeni gen regülasyonu mekanizmalarını aydınlatmakla kalmadı, RNA moleküllerinin yeni katalitik aktivitelerini de ortaya çıkardı.

Kesip-Ekleme (Splicing) Mekanizmaları

Pre-mRNA kesilip-eklenmesini anlamanın anahtarı, kesip-ekleme reaksiyonunu etkin bir şekilde gerçekleştiren, *in vitro* sistemlerin geliştirilmesi ile elde edildi (Şekil 6.43). Yapısal genlerin (intronları ile beraber), kolayca büyük miktarlarda izole edilebilen bakteriofaj RNA



Şekil 6.44 Pre-mRNA'nın kesilip-eklenmesi
Kesilip-eklenme reaksiyonu, iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama, 5' kesim noktasında (SS) kesim ve intronun 5' ucunun intron içindeki bir A ile (dallanma noktası) birleştirilmesini kapsar. Bu reaksiyon, intronun bir ilmik oluşturduğu, kement benzeri bir bir ara ürün meydana getirir. İkinci basamak, 3' kesim noktasında kesim ve eş zamanlı olarak eksonların bağlanması ile intronun, kement benzeri bir yapı halinde çıkartılması ile sonuçlanır.

polimeraz promotörlerine bağlanarak klonlanmasıyla, pre-mRNA'lar *in vitro* üretildi. Bu plazmidlerin transkripsiyonu, büyük miktarlarda pre-mRNA hazırlamak için kullanılabildi ve bunların üzerine memeli hücrelerinin nükleer özütü eklendiğinde, doğru şekilde kesilip-eklendikleri gösterildi. Transkripsiyonla olduğu gibi, bu tip *in vitro* sistemlerin kullanımı, kesip-ekleme işleminin, canlı hücrelerde olabileceğinden daha ayrıntılı olarak, analiz edilmesini sağladı.

In vitro koşullarda oluşturulan reaksiyon ara ürün ve ürünlerinin analizi, pre-mRNA kesilip-eklenme işleminin iki basamakta gerçekleştiğini ortaya koydu (Şekil 6.44). Önce, pre-mRNA 5' kesim noktasından kesilir ve intronun 5'ucu, intronun içindeki bir adenin nükleotidine bağlanır (3'ucuna yakın). Bu basamakta, intronun 5' ucu ile adenin nükleotidinin 2' hidroksil grubu arasında, alışılmadık bir bağ oluşur. Meydana gelen ara ürün, intronun bir ilmik oluşturduğu, kement benzeri bir yapıdır. Kesip-ekleme işleminde ikinci basamak, eş zamanlı olarak, 3' kesim noktasından kesim ve iki eksonun bağlanması ile devam eder. Böylece, intron, kement benzeri yapıda çıkartıldıktan sonra doğrusallaştırılır ve canlı hücrelerin nükleusunda yıkılır.

Bu reaksiyonlar, pre-mRNA'ların üç kritik dizi elemanını tanımlar: 5' kesim noktası dizileri, 3' kesim noktası dizileri ve intron içinde, dallanma noktasındaki diziler (kement benzeri yapıyı oluşturmak üzere intronun 5' ucunun bağlandığı nokta) (bkz. Şekil 6.44). Pre-mRNA'lar, bu pozisyonların her birinde, kesip-ekleme düzeneğinin, pre-mRNA'ları tanımasını ve işlemde yer alan kesme ve ekleme reaksiyonlarını gerçekleştirmesini sağlayan, benzer ortak (konsensus) diziler içerir.

Nükleer özütün biyokimyasal analizi, kesip-ekleme işleminin, **splisozomlar** adı verilen, protein ve RNA'lardan oluşmuş, büyük kompleksler içinde meydana geldiğini ortaya koymuştur. Splisozomun RNA bileşenleri; U1, U2, U4, U5 ve U6 adı verilen beş tip **küçük nükleer RNA'lardır (snRNA'lar)**. Yaklaşık olarak 50 ila 200 civarında nükleotidden oluşan snRNA'lar, altı ile on protein molekülü

ANAHTAR DENEY

snRNP'lerin Keşfi

Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus

Michael R. Lerner ve Joan A. Steitz
Yale University, New Haven, Connecticut

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1979, Volume 76, pages 5495-5499.

Joan Steitz

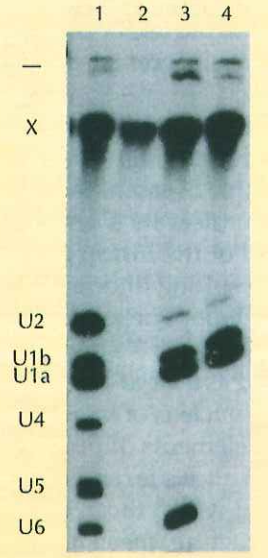
Bağlam

İntronların 1977 yılında keşfi, ökaryot hücrelerde mRNA üretimi için, tümüyle beklenmedik bir işlenme reaksiyonunun gerektiğine dikkat çekti. İntronlar, pre-mRNA'dan doğru şekilde çıkartılmalı ve bunu, olgun bir mRNA molekülü elde etmek için, eksonların birleştirilmesi takip etmeliydi. Pre-mRNA kesilip-eklenmesi işleminin beklenmedik doğası, kesip-ekleme reaksiyonunun mekanizmasının pek çok moleküler biyoloğun ilgisini çekmesini sağladı. Bu mekanizmanın aydınlatılmasındaki en önemli aşamalardan biri, snRNP'lerin bulunması ve pre-mRNA işlenmesiyle ilişkilerinin belirlenmesi olmuştur.

Küçük nükleer RNA'lar,1960'ların sonunda, ilk defa ökaryot hücrelerde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, snRNA'ların işlevleri bilinmezliğini korudu. Michael Lerner ve Joan Steitz, 1979'daki bu makalelerinde, snRNA'ların büyük bölümünün, snRNP denilen RNA-protein kompleksleri olarak bulunduklarını gösterdiler. Ayrıca, bu RNA-protein komplekslerinin pre-mRNA kesilip-eklenmesinde işlev görebileceğini, ilk kez ortaya attılar. snRNP'lerin tanımlanması, pre-mRNA kesilip-eklenmesindeki rollerini ve mekanizmayı aydınlatan çeşitli deneyelere öncülük etti.

Deneyler

snRNP'lerin tanımlanması, hastanın kendi normal hücre bileşenlerine karşı antikor ürettiği otoimmün bir hastalık olan, sistemik lupus eritematozisli hastaların antiserumlarının kullanılmasıyla sağlandı. Sistemik lupus eritematozisli hastaların ürettiği antikorların çoğu, doğrudan, DNA, RNA ve histonları da kapsayan nükleer bileşenlere karşıdır. snRNP'lerin keşfi, Michael Lerner ve Joan Steitz'ın, sistemik lupus eritematozisli hastaların antikorları tarafından tanınan, ribonükleoprotein (RNP) ve Sm olarak adlandırılan iki antijeni tanımlamaları ile gerçekleşti. Dolaylı veriler, RNP'nin, adının ima ettiği gibi, protein ve RNA dan oluştuğunu gösterdi, fakat, ne RNP ne de Sm, moleküler düzeyde tanımlanmadı.



Sistemik lupus eritematozis hastalarının antiserumları ile snRNA'ların, immün çökeltilmesi. Şerit 1, anti-Sm; şerit 2, normal kontrol serum; şerit 3, esas olarak RNP antijenini tanıyan antiserum; şerit 4, anti-RNP. X olarak belirtilen nonspesifik RNA'nın, kontrol de dahil, bütün çökeltilerde görüldüğüne dikkat edin.

RNP ve Sm antijenlerinin olası RNA bileşenini tanımlamak için, fare hücrelerinin nükleer RNA'ları ^{32}P ile radyoaktif olarak işaretlendi ve farklı sistemik lupus eritematozisli hastaların antiserumları ile immünçökeltildi (bkz. Şekil 3.30). Farklı hastaların antiserumlarıyla seçici olarak çöktürülen, ancak normal kontrol hastasının serumuyla etkilenmeyen, altı özel snRNA türü bulundu (şekle bakınız). Anti-Sm serumu, bu snRNA'ların U1a, U1b, U2, U4, U5 ve U6 olarak simgelenen altı tanesini immünçöktürdü. Anti-RNP serumu, yalnızca U1a ve U1b ile bağlanırken, üçüncü bir hastanın serumu (çoğunlukla anti-RNP olarak tanımlandı), U1a, U1b ve U6 ile immünçökelti sağladı. İmmünçökelen snRNA'lar, daha sonra, dizi analizi ile tanımlandı. Bu tanımlama, U1a, U1b ve U2 nin, memeli hücrelerinde, daha önce rapor edilen, en fazla miktarda bulunan snRNP'ler ile aynı olduğunu ve U1a ve U1b'nin, insan hücrelerinde bulunan U1 snRNA'ların tek bir türünün dizi değişikliklerini betimlediğini, gösterdi. U4, U5 ve U6 snRNA'lar ise, Lerner ve Steitz'in bu çalışmalarıyla, yeni tanımlandı.

Önemli olan, snRNA'ların antiserumla çöktürülmesinin, RNA-protein komplekslerinin bir bileşeni olduklarını göstermesiydi. snRNA'ların altısını da immünçökelten anti-Sm serumun, bir protein antijene karşı olduğu, önceden gösterilmişti. Benzer şekilde, anti-RNP serumunun antijeni

tanınması için de proteinin gerekli olduğu biliniyordu. Lerner ve Steitz, RNA'ların fenolle ekstraksiyonu sürecinde, önceden, proteinler uzaklaştırılırsa, snRNA'ların hiç birinin immünçökelmediğini gösterdiler. ^{35}S-metionin ile radyoaktif olarak işaretlenmş proteinler içeren hücrelerin ileri analizlerinde, anti-Sm ve anti-RNP serumu tarafından, snRNA'lar ile birlikte immünçökelen yedi nükleer protein tanımlandı. Bu veri, altı snRNA'nın her birinin, spesifik nükleer proteinler ile snRNP kompleksleri şeklinde bulunduğunu gösterdi.

Etki

snRNA'ların, özgül antiserumlar tarafından tanınan snRNP'lerin bileşeni olduğunun anlaşılması, snRNA işlevlerinin araştırılmasına yeni yaklaşımlar kazandırdı. Lerner ve Steitz, snRNA'ların "en ilgi çekici" olası rollerinin, pre-mRNA kesilip-eklenmesinde olanileceğini kaydettiler ve U1 snRNA'nın 5' ucu yakınındaki dizinin, kesim noktalarına komplementer olduğuna dikkat çektiler.

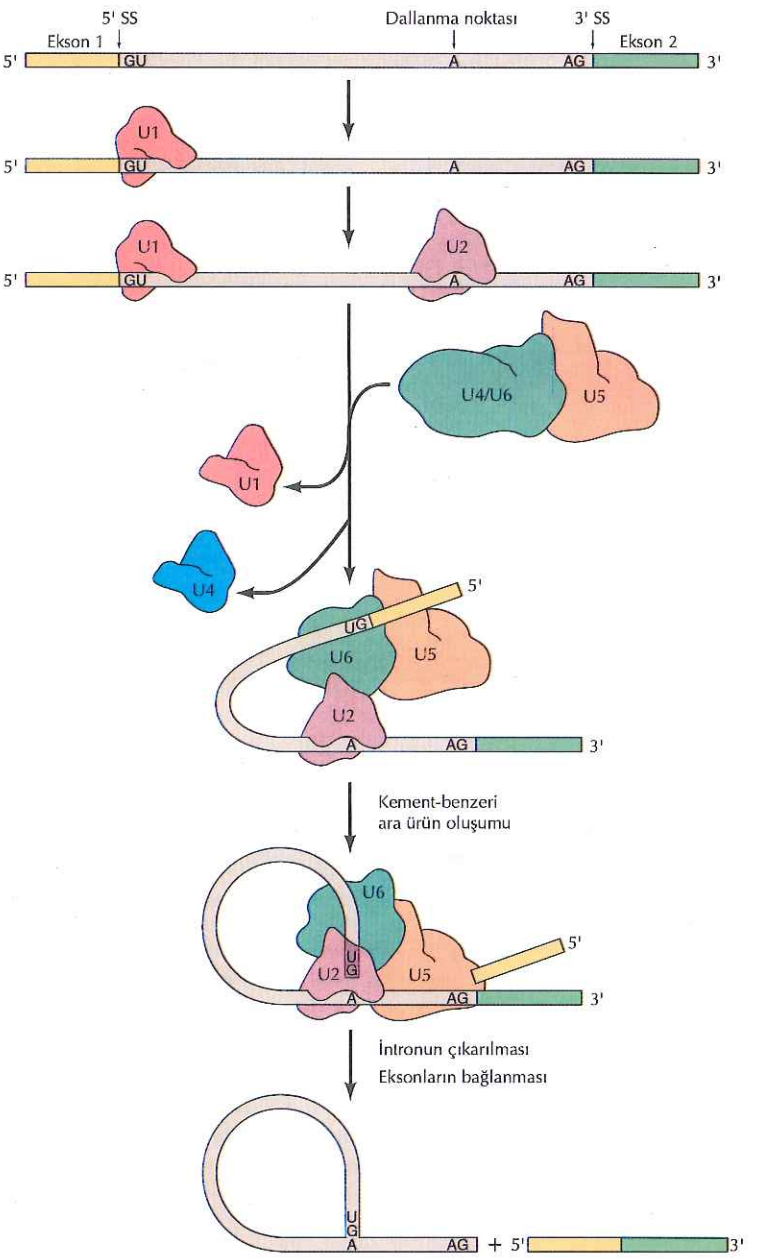
Steitz ve çalışma arkadaşları, snRNP'lerin kesilip-eklenme mekanizmasındaki olası kritik görevlerini kanıtlayan bir seri deneyle çalışmalarını sürdürdüler. Bu çalışmalar, U1 snRNA'nın korunmuş 5' dizisinin, 5' kesim noktasındaki ortak diziye eşleşiminin gösterildiği, daha kapsamlı dizi analizlerini içeriyordu. Bu eşleşim, U1'in, 5' kesim noktasını tanıma işlevi gördüğüne işaret ediyordu. snRNP'lere karşı antiserum, ayrıca, hem izole nükleuslar hem de *in vitro* özütlerde, pre-mRNA'nın kesilip-eklenmesi için U1'in gerekli olduğunu göstermek için kullanılmıştır. Çalışmalar, snRNA'ların yalnızca kesim yerlerinin tanınmasında değil, kesip-ekleme reaksiyonunun katalizlenmesinde de, kritik rol oynadığını göstererek devam etti. snRNA'ların, snRNP'lerin bir bileşeni olduklarının ve spesifik antiserumlar tarafından tanınabildiklerinin keşfi, böylece pre-mRNA kesilip-eklenme mekanizmasının anlaşılabilmesi için bir kapı açtı.

ile kompleks yaparak, kesip-ekleme işleminde merkezi rol oynayan **küçük nucleer ribonükleoprotein taneciklerini (snRNP)** meydana getirir. U1, U2 ve U5 snRNP'lerin her biri tek bir snRNA molekülü içerirken, U4 ve U6 snRNA'ları tek bir snRNP içerisinde kompleks oluşturur.

Splisozom yapılanmasında ilk basamak, U1 snRNP'in, pre-mRNA'nın 5' kesim bölgesine bağlanmasıdır (Şekil 6.45). 5' kesim noktasının tanınması, 5' kesim bölgesi konsensus dizini ile U1 snRNA'nın 5' ucundaki tamamlayıcı dizi arasında baz eşleşmesini gerektirir (Şekil 6.46). Daha sonra, U2 snRNP, dallanma noktası dizisi ile U2 snRNA arasında benzer şekilde baz eşleşmesi yoluyla, dallanma noktasına bağlanır. U4/U6 ve U5 snRNP'lerden meydana gelen, daha önceden oluşmuş bir kompleks, splisozoma katılır ve U5, 5' kesim bölgesinin yukarısındaki bir diziye bağlanır. Kesip-ekleme reaksiyonuna, snRNA'ların yeniden düzenlenmeleri eşlik eder. İlk reaksiyon basamağından (kement benzeri ara ürünün oluşumu, (bkz. Şekil 6.44) önce, U6, U4'den ayrılır, ve 5' kesim bölgesinde U1'le yer değiştirir. Daha sonra U5, 3' kesim noktasındaki diziye bağlanır ve bunu, intronun çıkarılması ile eksonların bağlanması izler.

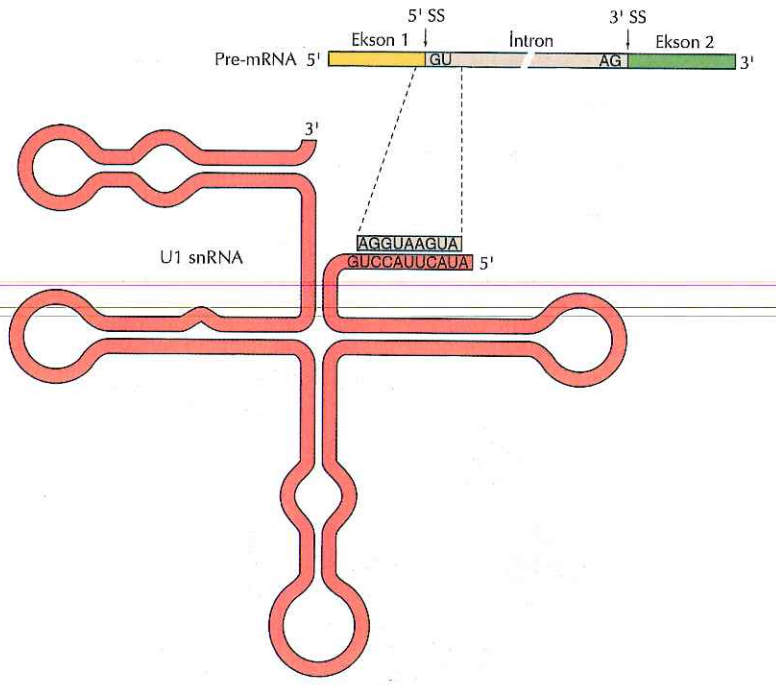
snRNA'lar, sadece, pre RNA'ların kesim bölgelerini ve dallanma noktalarındaki ortak dizileri tanımakla kalmaz, kesip-ekleme reaksiyonunu direk olarak katalizlerler. Kesip-ekleme işleminde RNA'ların katalitik rolü, bazı RNA'ların kendi-kesip-ekleme; yani diğer protein veya RNA faktörleri olmadan, kendi intronlarının çıkartılmasını katalizleyebilme kapasitelerinin keşfi ile gösterilmiştir. Kendi-kesip-ekleme, ilk kez Tom Cech ve çalışma arkadaşları tarafından, protozoa *Tetrahymena* 28S rRNA'sının incelenmesi sırasında tanımlanmıştır. Bu RNA, eklenen proteinlerin olmadığı bir ortamda, pre-rRNA'nın inkübasyonunu takiben çıkartılan, yaklaşık 400 bazlık bir intron içerir. Daha ileri çalışmalar, kesip-ekleme işleminin, pre-rRNA molekülünden kendi çıkarılmasını yönlendiren

Şekil 6.45 Splisozomun yapılanması
Splisozom oluşumundaki ilk basamak, U1 snRNP'nin, 5' kesim bölgesine (SS) bağlanması ve bunu takiben U2 snRNP'nin, dallanma noktasına bağlanmasıdır. U4/U6 ve U5 snRNP'leri içeren ve daha önceden oluşan bir kompleks, splisozoma katılır. U5, 5' kesim noktasının yukarısındaki dizilere bağlanır ve U6, U4'den ayrılır ve kement benzeri ara ürünün oluşumundan önce U1'le yer değiştirir. Daha sonra U5, 3' kesim bölgesine bağlanır, intronun çıkartılması ve eksonların bağlanması bunu takip eder.



bir ribozim olarak davranan bir intron tarafından, katalizlendiğini ortaya koymuştur. *Tetrahymena* rRNA'sının kendi-kesip-çıkarma işleminin keşfi ile birlikte, daha önce tartıştığımız RNaz P çalışmaları, RNA'nın katalitik aktivitesinin ilk gösterimlerini sağlamıştır.

Ek çalışmalar, mitokondri, kloroplast ve bakterilerde kendi-kesip-ekleyen RNA'ları ortaya koymuştur. Bu kendi-kesip-ekleyen RNA'lar, reaksiyon mekanizmalarına göre iki sınıfa ayrılır (Şekil 6.47). Grup I intronlar (örn., *Tetrahymena* pre-rRNA'sı) için kesip-ekleme işleminde ilk basamak, bir guanozin kofaktör tarafından yönlendirilen, 5' kesim bölgesinin kesilmesidir. Daha sonra, serbest eksonun 3'ucu, intronu

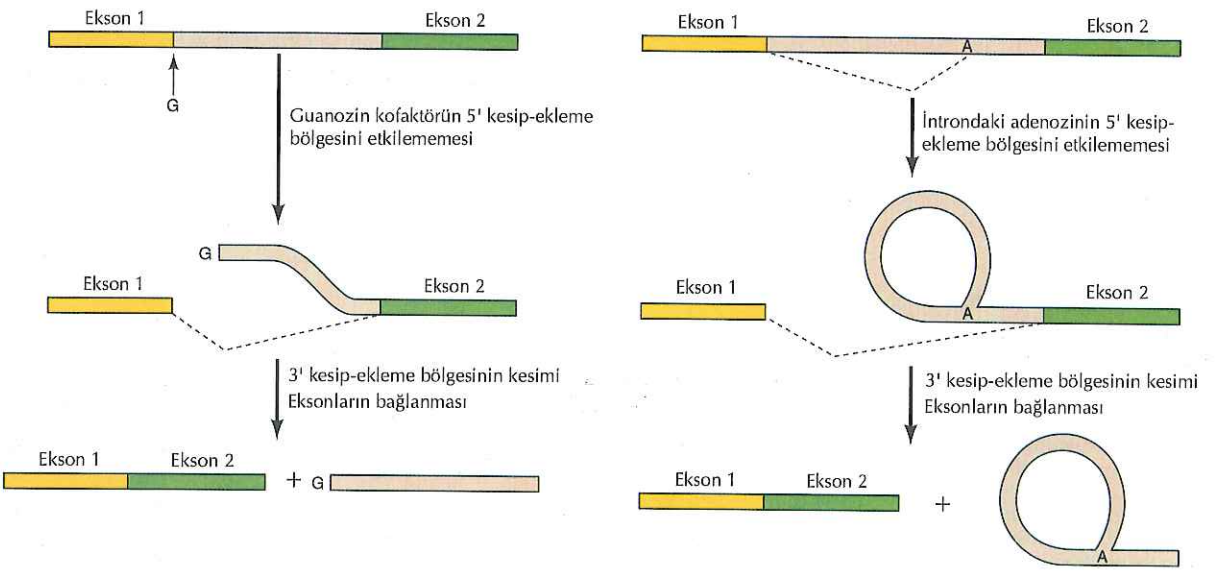


Şekil 6.46 U1 snRNA'nın, 5' kesim bölgesine bağlanması
U1 snRNA'nın 5'ucu, komplementer baz eşleşmesi ile, 5' kesim noktasındaki ortak dizilere bağlanır.

doğrusal bir RNA olarak çıkarmak için, 3' kesim noktası ile reaksiyona girer. Bunun aksine, grup II intronların (örn., bazı mitokondrial pre-mRNA'lar) kendi-kesip-ekleme reaksiyonları, intron içindeki bir adenin nükleotidinin etkisi ile 5' kesim noktasının kesildiği, nükleer pre-mRNA kesip-ekleme mekanizmasına çok benzer. Pre-mRNA kesilip-eklenme işleminde olduğu gibi, sonuç, daha sonra kesilip çıkartılan kement benzeri bir ara üründür.

Splisiozom-aracılı pre-mRNA kesilip-eklenme işlemi ile, grup II intronların kendi-kesip-ekleme işlemi arasındaki benzerlik, splisozomun aktif katalitik bileşenlerinin, proteinlerden ziyade RNA'lar olduğunu akla getirmektedir. Bu benzerlikler özellikle, pre-mRNA kesilip-eklenme işleminin, splisiozomun snRNA'ları

Şekil 6.47 Kendi-kesip-ekleyen intronlar
Grup I ve grup II kendi-kesip-ekleyen intronlar, reaksiyon mekanizmaları ile ayırt edilirler. Grup I intronlarda, kesip-ekleme işleminde ilk basamak, bir guanozin kofaktör ile reaksiyona girerek 5' kesim bölgesinin kesilmesidir. Sonuç, intronun 5' ucuna G eklenmiş bir doğrusal ara üründür. Grup II intronlarda (pre-mRNA kesilip-eklenme işleminde olduğu gibi) ilk basamak, intron içinde bir A ile reaksiyon sonucu 5' kesim bölgesinin kesilmesi ve kement benzeri ara ürünün oluşumudur. Her iki durumda da ikinci basamak, eş zamanlı olarak, 3' bölgelerinin kesilmesi ve eksonların birbirine eklenmesidir.

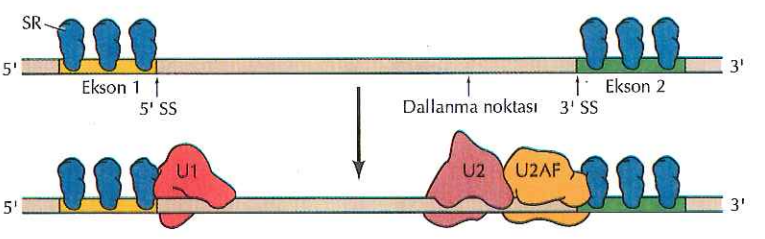


tarafından katalizlendiği izlenimini uyandırmaktadır. Pre-mRNA kesip-ekleme işlemi üzerinde devam eden ve proteinlerin yokluğunda, U2 ve U6 snRNA'ların pre-mRNA kesip-ekleme işleminde ilk basamağı katalizleyebildiğini de gösteren çalışmalar, bu görüşe açık bir destek sağladı. Böylece, pre-mRNA kesip-ekleme işlemi, grup II kendi-kesip-ekleyen intronlara benzer şekilde, splisozom snRNA'ları tarafından katalizlenen, RNA temelli bir reaksiyon olarak benimsendi. Hücre içinde, snRNP'lerin protein bileşenleri, yine de gereklidir ve hem splisozom yapılanmasında hem de kesip-ekleme reaksiyonunda yer alır.

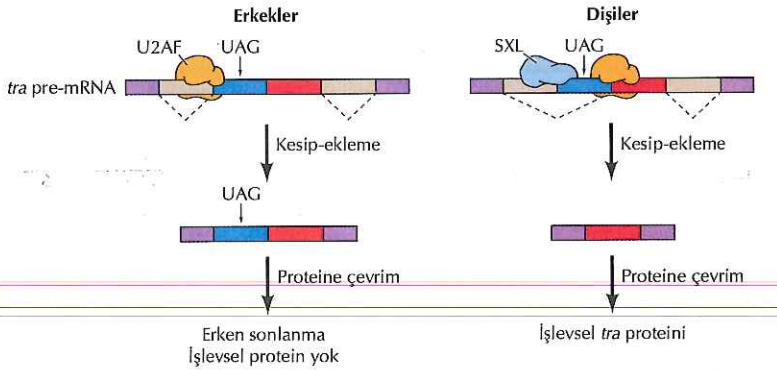
snRNP bileşeni olmayan bir dizi protein kesip-ekleme faktörü de, özellikle pre-mRNA'larda doğru kesim bölgelerinin tanınmasında olmak üzere, splisozom yapılanmasında kritik rol oynarlar (Şekil 6.48). Memeli pre-mRNA'ları, daha büyük intronlarla (ortalama 3,500 nükleotid) ayrılan, çok sayıda, kısa eksonlar (insanlarda ortalama 150 nükleotid) içerir. İntronlar sıklıkla, kesim bölgelerine benzeyen bir çok dizi içerir, kesip-ekleme düzeneği, işlevsel bir mRNA oluşturabilmek için, intron/ekson sınırlarında uygun 5' ve 3' kesim bölgelerini tanımlayabilmelidir. Kesip-ekleme faktörleri, ekson içinde spesifik RNA dizilerine bağlanarak, splisozomların doğru kesim noktasına yönlenmelerini ve sonrasında protein-protein etkileşimleri ile, U1 ve U2 snRNP'lerin pre-mRNA üzerinde uygun bölgelere yerleşmelerini sağlar. Buna ek olarak, kesip-ekleme faktörleri, kesip-ekleme işlemi ile transkripsiyonu, RNA polimeraz II'nin fosfatlanmış CTD'ine bağlanarak, birbirine kenetlerler. Kesip-ekleme düzeneğinin, RNA polimeraza sıkıca tutunmasının, eksonların, pre-mRNA sentezlenirken, doğru sırada birleştirilmelerini sağlamak açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Alternatif Kesip-Ekleme

Pre-mRNA işlenmesinde kesip-ekleme işleminin merkezi rol oynaması, gen ekspresyonu düzenlenmesinin, kesip-ekleme düzeneğinin kontrolünde olma olasılığını gündeme getirdi. Çoğu pre-mRNA, bir çok intron içerdiğinden, aynı genin 5' ve 3' kesim bölgelerinin farklı kombinasyonları ile farklı mRNA'lar üretilebilir. Eksonları çeşitli kombinasyonlarda birleştirme olasılığı, aynı pre-mRNA'dan çok sayıda mRNA meydana getirerek (ve bu yüzden birçok protein), gen ekspresyonunun kontrolünde yeni bir yol sağlar. **Alternatif kesip-ekleme** adı verilen bu olay, kompleks ökaryotların genlerinde sık görülür. Örneğin, alternatif kesip-eklemenin, ortalama memeli geninden, üç veya daha fazla mRNA üretimi ile sonuçlanacağı tahmin edilmekte, ve bu durum, memeli genomlarındaki tahmini 30,000-40,000 gen ile kodlanabilecek proteinlerin çeşitliliğini önemli ölçüde artırmaktadır. Alternatif kesip-ekleme modelleri farklı dokularda değişebileceğinden, alternatif kesip-ekleme, gen ekspres-



Şekil 6.48 Splisozom yapılanmasında kesip-ekleme faktörlerinin rolü
Kesip-ekleme faktörleri (SR proteinleri), eksonlar içindeki spesifik dizilere bağlanır. SR proteinleri, U1 snRNP'yi 5' kesim bölgesine ve diğer bir kesip-ekleme faktörünü (U2AF), 3' kesim bölgesine yerleştirir. Daha sonra U2AF, U2 snRNP'yi dallanma noktasına getirir.



Şekil 6.49 *Drosophila* cinsiyet belirlenmesinde alternatif kesip-ekleme
Transformer (tra) mRNA'sının alternatif kesip-ekleme işlemi, sadece dişi sineklerde eksprese edilen SXL proteini ile düzenlenir. Erkeklerde, tra mRNA'nın ilk eksonu, bir 3' kesim bölgesine bağlanarak translasyon sonlanma kodonu içeren ikinci bir ekson meydana getirir ve böylece hiç tra proteini sentezlenmez. Dişilerde, SXL proteininin bağlanması U2AF'nin bu 3' kesim bölgesine bağlanmasını engelleyerek, ekson 2'de daha aşağıdaki alternatif bir bölgenin kullanılmasına yol açar. Bu alternatif 3' kesim bölgesi, translasyon sonlandırma kodonunun aşağısındadır ve böylece dişilerde eksprese edilen mRNA işlevsel *tra* proteini sentezini sağlar.

yonunun doku spesifik ve gelişimsel düzenlenmeleri için önemli bir mekanizma oluşturur.

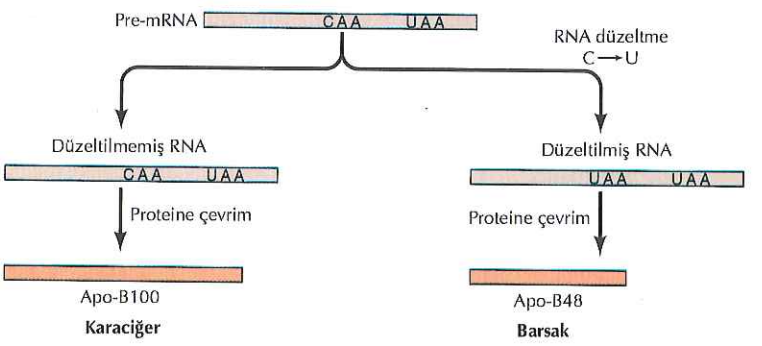
Doku spesifik alternatif kesip-ekleme için iyi çalışılmış bir örnek, aynı pre-mRNA'nın alternatif kesip-eklenmesinin sineğin erkek veya dişi olmasını belirlediği, *Drosophila*'da cinsiyet belirlenmesidir (Şekil 6.49). *Transformer* adı verilen bir genin pre-mRNA'sının alternatif kesilip-eklenmesi, sadece dişi sineklerde eksprese olan bir protein (SXL) ile kontrol edilir. *Transformer* pre-mRNA üç eksona sahiptir, fakat iki farklı cinste, alternatif 3'kesim bölgelerinin kullanılması sonucunda, mRNA'ya farklı bir ikinci ekson katılır. Erkeklerde, ekson 1, U2AF kesip-ekleme faktörünün ekson 2'deki dizilere bağlanmasıyla belirlenen, 3' kesim bölgelerinin oldukça yukarısına bağlanır. Dişilerde SXL proteini ekson 2'deki bu bölgeye bağlanarak, U2AF'nin bağlanmasını engeller. Sonuç olarak, dişilerde, yukardaki 3'kesim bölgesi atlanır ve bunun yerine ekson 1, daha aşağıdaki bir alternatif 3' kesim bölgesine bağlanır. Erkek *transformer* mRNA'sında bulunan ekson 2 dizileri, proteine çevrimi sonlandırıcı kodon içerirler ve böylece hiç protein üretilmez. Bu sonlandırıcı kodon, dişi mRNA'sında bulunmaz ve dişi sinekler, cinsiyet belirlenmesinde anahtar düzenleyici olarak davranan, fonksiyonel *transformer* proteinini eksprese ederler.

Transformer'ın alternatif kesilip-eklenmesi, bir kesip-ekleme faktörünün (U2AF) bağlanmasını bloklayarak fonksiyon gösteren bir represörün (SXL proteini) etkisini açıklamaktadır. Diğer durumlarda alternatif kesip-ekleme, başka şekilde tanınmayacak kesim bölgelerine, kesip-ekleme faktörlerini bağlayan aktivatörlerle kontrol edilir. Böylece, alternatif kesip-eklemeyi bir çok mekanizma denetleyebilir ve alternatif kesip-ekleme çeşitliliği, gelişim ve farklılaşma sürecinde sentezlenmesi gereken proteinlerin çeşitliliğine büyük bir katkı sağlar.

RNA Düzeltme (Editing)

RNA düzeltme, bazı mRNA'ların protein kodlayan dizilerini değiştiren RNA işlenmesi olaylarını (kesip-ekleme dışında) kapsar. RNA işlenmesinin bu umulmadık şekli, ilk kez tripanozomların mitokondri mRNA'larında keşfedilmiştir, burada, molekül boyunca birçok bölgede U nükleotidler eklenmiş ve çıkartılmıştır. Daha yakın zamanda, düzeltmeler, diğer organizmaların mitokondri mRNA'larında, yüksek bitkilerin kloroplast mRNA'larında ve bazı memeli genlerinin nükleer mRNA'larında da tanımlanmıştır.

Yüksek bitkilerin kloroplast RNA'ları ve mitokondrial RNA'larda olduğu gibi, memeli nükleer mRNA'larındaki düzeltme, tRNA işlenmesinde görülenlere benzer şekilde, baz modifikasyon



Şekil 6.50 Apolipoprotein B mRNA'sının düzeltilme işlemi
İnsan karaciğerinde, düzeltilmemiş mRNA, Apo-B100 adı verilen 4536 amino asitlik bir ürün vermek üzere proteine çevrilir. İnsan barsağında, mRNA, C'i U'e değiştiren temel bir değişiklikle düzeltilir. Bu modifikasyon glutamin için olan kodonu (CAA), sonlandırma kodonuna (UAA) değiştirerek, daha kısa bir proteinin (sadece 2152 amino asitten oluşan Apo-B48) sentezi ile sonuçlanır.

reaksiyonlarının sonucu olarak, tek baz değişikliklerini kapsar. Memeli hücrelerinde, RNA düzeltme reaksiyonları, sitozinin üridine ve adenozinin inozine deaminasyonunu içerir. En iyi çalışılan örneklerden biri, kanda lipidleri taşıyan apolipoprotein B mRNA'sının düzeltilme işlemidir. Burada, doku spesifik RNA düzeltme, apolipoprotein B'nin iki farklı formunu oluşturur (Şekil 6.50). İnsanlarda, Apo-B100 (4536 amino asit) düzeltilmemiş mRNA'nın çevrimi ile karaciğerde sentezlenir. Ancak, daha kısa bir protein (Apo-B48, 2152 amino asit), deaminasyon ile C'nin U'e değiştiği, düzeltilmiş mRNA'nın çevrimi ile barsaklarda sentezlenir. Bu değişiklik, düzeltilmemiş mRNA'daki glutamin kodonunu (CAA), düzeltilmiş mRNA'da, çevrim sonlanma kodonuna dönüştürerek, daha kısa Apo-B proteininin sentezine yol açar. Apo-B mRNA'sının dokuya-özgül düzeltme işlemi böylece, karaciğer ve barsakta yapısal ve fonksiyonel olarak farklı proteinlerin ekspresyonu ile sonuçlanır. Karaciğerde üretilen tam uzunluktaki Apo-B, dolaşımda lipidleri taşır; Apo-B 48, diyetle alınan lipidlerin barsaklarda emiliminde işlev görür.

Adenozinin inozine deaminasyonu şeklindeki RNA düzeltme işlemi, memelilerdeki nükleer RNA düzeltme işleminin en sık rastlanan tipidir. Bazı sinyal molekülleri için nöronların yüzeyindeki reseptörlerde tek amino asit değişiklikleri ile sonuçlanan A'in I'e düzeltilme işlemi, sinir sisteminde önemli rol oynar. Düzeltme reaksiyonunun önemi, farelerde A'in I'e düzeltilme işleminden sorumlu enzimi kodlayan genin homolog rekombinasyonla inaktivasyonu ile açıkça ortaya konmuştur (bkz. Bölüm 3). Bu enzimi üretemeyen fareler, reseptörlerin, uygun şekilde düzeltilememelerine bağlı işlevsizlikleri nedeniyle, tekrarlayan epileptik nöbetler sonrası, genç yaşta ölürler.

RNA Yıkımı

Önceki bölümde tartışılan işlenme basamakları, olgun mRNA'ların oluşumu ile sonuçlanır ve bunlar daha sonra sitoplazmaya taşınarak protein sentezini yönlendirmede işlev görürler. Bununla birlikte, pre-mRNA'ya transkribe olan dizilerin büyük kısmı nükleus içerisinde yıkılır. Pre-mRNA dizilerinin %90'ından fazlası, kesip-ekleme ile çıkarılmalarını takiben, çekirdek içinde yıkılan intronlardır. Bu olay, dallanma noktasında meydana gelen tek 2'-5' bağını tanıyan bir enzimle ya da, RNA moleküllerinin 5' veya 3' uçlarını tanıyan enzimlerin her iki yönde RNA'nın yıkımını katalizlemesi ile gerçekleşir. İşlenmiş mRNA'ların 5' ve 3' uçları, bu yıkım mekanizmasından sırasıyla, başlık eklenmesi ve poliadenillenme ile korunurlarken, intronların korunmayan uçları tanınır ve yıkılırlar.

Hücre, intronların yıkımına ek olarak, tam açık-okuma çerçevesi bulunmayan mRNA'ların yıkımına yol açan bir kalite kontrol sistemi

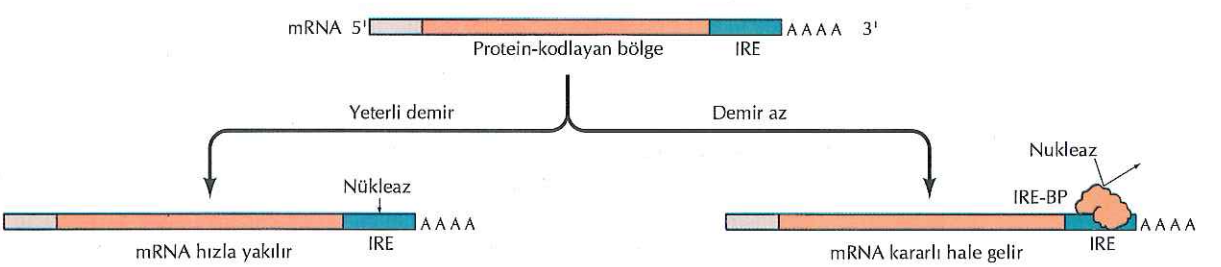
(**anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı** denir) bulundurur. Hatalı mRNA molekülleri yok edilerek, kısaltılmış anormal proteinlerin sentezi önlenir. Mayalarda, anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı, sitoplazmada gerçekleşir ve protein sentezi sırasında ribozom, erken bir sonlanma kodonu ile karşılaştığında tetiklenir. Memelilerde ise, anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı, en azından kısmen, nükleusta meydana gelir. Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar, çekirdek içindeki ribozomların nükleer mRNA'ları tanıdığını ve hatta proteine çevirdiğini öne sürmesine rağmen, memeli hücrelerinde çekirdek içinde sonlandırma kodonlarının tanınma mekanizması henüz anlaşılmamıştır.

Bir RNA molekülünün işlenmesinin en son aşaması olarak, en sonunda sitoplazmada yıkılması düşünülebilir. Herhangi bir RNA'nın hücre içi düzeyi, yapımı ile yıkımı arasındaki denge ile belirlendiğinden, RNA'nın yıkım hızı, gen ekspresyonu kontrolünde diğer bir basamağı oluşturur. Ribozomal ve taşıyıcı RNA'lar kararlı moleküllerdir ve bu kararlılık, prokaryot ve ökaryot hücrelerde bu RNA'ların yüksek düzeylerde (tüm RNA'ların %90'ından daha fazla) bulunmalarının nedenidir. Bunun aksine, bakteri mRNA'ları hızla yıkılır, yarı ömürleri genellikle, sadece 2-3 dakika kadardır. Bakteri mRNA'ların bu hızlı dönüşümü, büyüme için gerekli besinlerin miktarındaki değişiklikler gibi çevresel değişikliklere, hızla cevap vermesini sağlar. Öte yandan, ökaryot hücrelerde farklı mRNA'lar, ökaryot gen ekspresyonunun denetimine, ek bir parametre sağlayarak, farklı hızlarda yıkılırlar.

Ökaryot mRNA'larının çoğunun sitoplazmik yıkımı, poli-A kuyruklarının kısaltılması ile başlar. Bunu, 5' başlığın ortadan kaldırılması ve her iki uçtan etkileyen nükleazlar ile RNA'nın yıkımı izler. Memeli hücrelerinde mRNA'ların yarı ömrü, 30 dakika ile yaklaşık 20 saat arasında değişir. Kararlı olmayan mRNA'lar genellikle, çevresel uyarılara yanıt olarak hücre içi düzeyleri hızla değişen belirli transkripsiyon faktörlerini de kapsayan, regülatör proteinleri kodlarlar. Bu mRNA'lar, 3' uçlarına yakın yerleşimde, AU zengin ve adeninlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak hızlı yıkım sinyali veren, özgül diziler içerir.

Bazı mRNA'ların kararlılığı, hücre dışı sinyallere yanıt olarak da düzenlenebilir. Memeli hücreleri tarafından demir alımında görevli, bir hücre yüzey proteini olan transferrin reseptörünü kodlayan mRNA, buna güzel bir örnektir. Hücredeki transferrin reseptörü miktarı, büyük oranda, mRNA'sının kararlılığını etkileyen demirin varlığı ile düzenlenir (Şekil 6.51). Yeterli miktarlarda demir varlığında, transferrin reseptör mRNA'sı, 3'ucuna yakın bir diziden özgül nükleaz kesimi ile, hızla yıkılır. Eğer yeterli miktarda demir bulunmuyorsa, mRNA kararlı hale gelir, transferrin reseptör sentezi artar ve hücre

Şekil 6.51 Transferrin reseptör mRNA'sının regülasyonu
Transferrin reseptör mRNA düzeyleri demirin varlığı ile denetlenir. Eğer demir miktarı yeterli ise, 3' ucu yakınlarından nükleaz kesimi sonucu, mRNA hızla yıkılır. Eğer demir az ise, bir regülatör protein (demir yanıt elemanına-bağlanan protein, veya IRE-BP denir) mRNA'nın 3' ucuna yakın bir diziye (demir yanıt elemanı, veya IRE) bağlanarak mRNA'yı nükleaz kesiminden korur.



tarafından daha fazla demir alınır. Bu düzenlenme, transferrin reseptör mRNA'sının 3' ucuna yakın spesifik dizilere (demir yanıt elemanı veya IRE adı verilir) bağlanan ve mRNA'yı kesimden koruyan bir protein ile sağlanır. Bu düzenleyici proteinin IRE'e bağlanması, hücre içi demir düzeyi ile denetlenir: eğer demir az ise, protein IRE'a bağlanır ve transferrin reseptör mRNA'sını yıkımdan korur. Diğer mRNA'ların kararlılığındaki benzer değişiklikler belirli hormonlarla gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Böylece, transkripsiyon, gen ekspresyonunun düzenlendiği ilk düzey olmasına karşın, mRNA yıkım hızındaki değişiklikler, hücre içinde durgun durumdaki mRNA düzeylerini kontrol etmede önemli rol oynar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

RNA polimeraz, promotör, ayak izi çıkartma

operon, operatör, represör, *cis*-etkili kontrol elemanları, *trans*-etkili faktör

transkripsiyon faktörü, genel transkripsiyon faktörü, TATA kutusu, TATA'ya-bağlanan protein (TBP), TBP-bağlanan faktör (TAF), aracı

güçlendirici, yalıtıcı

ÖZET

PROKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON

RNA Polimeraz ve Transkripsiyon: *E. coli* RNA polimerazı, α, β, β′, ω ve σ alt birimlerinden oluşur. Transkripsiyon, α'nın promotör dizilere bağlanması ile başlatılır. Takriben, RNA'nın ilk on nükleotidi sentez edildikten sonra, çekirdek polimeraz α'dan ayrılır ve kalıp DNA üzerinde hareket ederek, RNA zincirini uzatır. Polimeraz, bir sonlandırma sinyaline rastlayana kadar, transkripsiyon devam eder.

Represörler ve Transkripsiyonun Negatif Kontrolü
Bakterilerde gen denetlenmesinin prototip modeli, bir represörün promotör içindeki özgül DNA dizilerine bağlanarak düzenlediği, *lac* operonudur.

Transkripsiyonun Pozitif Kontrolü: Bazı bakteri genleri, represörler yerine transkripsiyon aktivatörleriyle regüle edilirler.

ÖKARYOT RNA POLİMERAZLARI VE GENEL TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

Ökaryot RNA Polimerazı: Ökaryot hücreler, mRNA (polimeraz II), rRNA (polimeraz I ve III) ve tRNA'ları (polimeraz III) kodlayan genleri kopyalayan, üç farklı nükleer RNA polimeraz içerirler.

Genel Transkripsiyon Faktörleri ve RNA Polimeraz II ile Transkripsiyonun Başlaması: Ökaryot RNA polimerazları promotör dizilere doğrudan bağlanmazlar; transkripsiyonu başlatmak için ek proteinlere (genel transkripsiyon faktörleri) ihtiyaç duyarlar. Bir çok polimeraz II geninin promotör dizileri, ek transkripsiyon faktörlerini ve RNA polimerazı promotöre bağlayan TATA'ya-bağlanan protein ile tanınır.

RNA Polimeraz I ve III ile Transkripsiyon: RNA Polimeraz I ve III, rRNA, tRNA, ve bazı snRNA genlerinin promotörlerine bağlanmak için, ek transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarlar.

ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYONUN DÜZENLENMESİ

Cis-etkili Düzenleyici Diziler: Promotörler ve Güçlendiriciler: Ökaryotik genlerin transkripsiyonu, transkripsiyonun başlangıç bölgesinden birçok kilobaz uzakta lokalize olabilen regülatör dizilere bağlanan proteinlerle kontrol edilir. Güçlendiriciler, tipik olarak gen ekspresyonunu düzenlemek için birlikte çalışan birçok protein için bağlanma bölgeleri içerirler.

Transkripsiyon Düzenleyici Proteinler: Birçok ökaryotik transkripsiyon faktörü, spesifik DNA dizilerine bağlanmaları temelinde, izole edilmişlerdir.

elektroforetik-devingenlik-değişim analizi, DNA-afinite kromatografisi

Transkripsiyonel Aktivatörlerin Yapı ve Fonksiyonu: Transkripsiyonel aktivatörler, farklı DNA'ya- bağlanan ve aktivasyon alanlarından oluşan modüler proteinlerdir. DNA bağlayıcı bölgeler, spesifik regülatör dizilerle ilişkiyi yönlendirirken, aktivasyon bölgeleri, kromatin yapısını değiştiren koaktivatörlerle olduğu gibi, genel transkripsiyon faktörleri ve aracı proteinlerle etkileşime girerek, transkripsiyonu uyarırlar.

transkripsiyon aktivatörü, çinko parmak bölge, steroid hormon reseptörü, sarmal-dönüş-sarmal, homeodomeyn, homeokutusu, lösin fermuarı, sarmal-ilmik-sarmal, koaktivatör

Ökaryot Represörleri: Ökaryot hücrelerdeki gen ekspresyonu, aktivatörlerle olduğu gibi represörlerle de düzenlenir. Bazı represörler, aktivatörlerin veya genel transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanması ile etkileşir. Diğer represörler, kromatin yapısını etkileyen korepresörler, transkripsiyon aktivatörleri veya genel transkripsiyon faktörlerinden biriyle etkileşerek, transkripsiyonu inhibe eden hassas baskılama alanları içerirler.

korepresör

Kromatin Yapısının Transkripsiyonla İlişkisi: DNA'nın nükleozomlar içinde paketlenmesi, ökaryot hücrelerde transkripsiyona bir engel teşkil eder. Histonların asetillenerek değiştirilmesi, nükleozomal DNA'nın transkripsiyon faktörlerince ulaşılabilirliğini artırır ve kromatinin bu modifikasyonu, transkripsiyonel regülasyon ile sıkıca bağlantılıdır. Histon asetillenmesini katalizleyen enzimler, transkripsiyonel aktivatörlerle ilişkili iken, histon deasetilazlar represörlerle ilişkilidir. Histonlar, fosfatlanma ve metillenme ile de değiştirilir ve histonların spesifik modifikasyonları diğer düzenleyici proteinler için bağlanma bölgeleri olarak görev yaparak, gen ekspresyonunu etkiler. Buna ek olarak, nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri, nükleozomların yerleşim veya yapısını değiştirerek, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırırlar. Daha sonra RNA polimeraz, histon-DNA temasını bozarak, nükleozomlar boyunca transkripsiyon yapabilir. Nonhiston HMGN kromozomal proteinler ve uzama faktörleri, histon asetiltransferazları bağlamak için olduğu kadar, nükleozom yapısını bozmak suretiyle de etki yaparak, transkripsiyonel uzamayı kolaylaştırılır.

HMGN proteinleri, histon asetillenmesi, histon kodu, nükleozom yeniden biçimlendirme faktörü, uzama faktörü

Kodlamayan RNA'larla Transkripsiyonun Düzenlenmesi: Transkripsiyon, regülatör proteinlerle olduğu gibi kodlamayan RNA'larla da düzenlenebilir. X kromozom inaktivasyonu, memelilerde kodlamayan RNA ile gen regülasyonuna bir örnek teşkil eder.

X kromozomu inaktivasyonu

DNA Metillenmesi: Sitozin birimlerinin metillenmesi, omurgalı genlerinin transkripsiyonunu inhibe edebilir. Metillenme ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi, memeli gelişiminde yer alan bazı genlerin transkripsiyonunu kontrol eden genomik damgalanmada önemli bir rol oynar.

Genomik damgalanma

RNA İŞLENMESİ VE DÖNÜŞÜMÜ

Ribozomal ve Taşıyıcı RNA'ların İşlenmesi: Ribozomal ve Taşıyıcı RNA'lar hem prokaryot hem ökaryot hücrelerde, uzun primer transkriptlerin kesimi ile meydana getirilir. Ribozomal RNA'lara metil grupları eklenirken, tRNA'larda çeşitli bazlar modifiye edilir.

pre-rRNA, pre-tRNA, RNaz P, ribozim

Ökaryotlarda m-RNA'nın İşlenmesi: Ökaryotlarda pre-mRNA'lar, kesip-ekleme ile intronların çıkarılmasına ek olarak, 7-metilguanozin başlık ve 3' poli-A kuyruğu eklenmesi ile modifiye edilir.

pre-mRNA, 7-metilguanozin başlık, poli-A kuyruğu, poliadenillenme

splisozom, küçük nükleer RNA (snRNA), snRNP, kendi-kesip-ekleme

Kesip-Ekleme Mekanizmaları: Nükleer pre-mRNA'ların kesilip-eklenme işlemi, proteinler ve küçük nükleer RNA'lardan (snRNA) oluşan ve splisozom adı verilen büyük komplekslerde yer alır. snRNA'lar, pre-mRNA'ların kesim bölgelerindeki dizileri tanır ve kesip-ekleme reaksiyonunu katalizler. Bazı mitokondri, kloroplast ve bakteri RNA'ları, kesip-ekleme reaksiyonunun intron diziler tarafından katalizlendiği kendi-kesip-ekleme işlemine girer.

alternatif kesip-ekleme

Alternatif Kesip-Ekleme: Kompleks ökaryotlarda, eksonlar, gen ekspresyonunun dokuya spesifik kontrolünde önemli bir mekanizma sağlayan alternatif kesip-ekleme sonucunda, farklı kombinasyonlarla birleştirilebilir.

RNA düzeltme

RNA Düzeltme: Bazı mRNA'lar, protein kodlayan dizilerini değiştiren işlenme olayları ile modifiye edilir. Bazı protozoalarda, mitokondrimRNA'larının düzeltilmesi, moleküldeki birçok bölgede U nükleotidlerin eklenmesini ve çıkarılmasını kapsar. Bitki ve memeli hücrelerindeki diğer RNA düzeltme şekilleri, spesifik bazların modifikasyonunu içerir.

anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı

RNA Yıkımı: İntronlar çekirdek içinde yıkılır ve açık-okuma-çerçevesi olmayan anormal mRNA'lar, anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı ile yok edilirler. Ökaryot hücrelerdeki fonksiyonel mRNA'lar, farklı hızlarda yıkılarak, gen ekspresyonunun kontrolü için ek bir mekanizma sağlarlar. Bazı olgularda, mRNA yıkımının hızı, hücre dışı sinyallerle düzenlenir.

Sorular

1. Laktoz, *E.coli*'nin laktozu alıp metabolize etmesi için gerekli proteinlerin ekspresyonunu nasıl indükler?

2. *E.coli*'nin –10 promotör elemanının konsensus dizisi, TATAAT'dır. Sırasıyla, TATGAT ve CATGAT –10 eleman dizilerine sahip iki promotörü karşılaştırıyorsunuz. Hangisinin daha etkin bir şekilde transkribe edileceğini beklersiniz?

3. İki *E.coli* suşu ile çalışıyorsunuz. Biri yabanıl tip β-galaktozidaz geni ve bir *i*⁻ mutasyonu, diğeri sıcaklığa duyarlı β-galaktozidaz geni ve bir o^c mutasyonu içeriyor. Bu suşları eşleştirdikten sonra, laktoz yokluğunda, izin veren ve izin vermeyen sıcaklıklarda β-galaktozidaz üretimini çalışıyorsunuz. Ne bulmayı beklersiniz?

4. DNA ayakizi çıkarma, bir proteinin, spesifik bir DNA dizisine bağlandığını nasıl gösterir?

5. Bakteriyel RNA sentezinde, sigma (σ) faktörünün rolü nedir?

6. *E.coli* mRNA'sı nasıl sonlanır?

7. Ökaryotik hücreler, üç farklı RNA polimeraza sahiptir. Herbiri hangi RNA'ları sentezler?

8. Biri TATA kutusu, diğeri sadece Inr dizini içeren iki polimeraz II geninin, *in vitro* bazal transkripsiyon gereksinmelerini karşılaştırıyorsunuz. Bu promotörlerden transkripsiyon TBP veya TFIID'ye gereksinir mi?

9. Ökaryotlarda cis-etkili regülatör diziler olarak güçlendiricilerin, promotörlerden farkı nedir?

10. Sadece nöronlarda eksprese edilen bir genin güçlendiricisini çalışıyorsunuz. Bir raportör gen ile bağlantılı bu güçlendirici yapılar, nöron hücrelerinde eksprese edilirken fibroblastlarda edilmez. Bununla birlikte, güçlendirici içinde spesifik bir dizi elemanını mutasyona uğratırsanız, hem fibroblastlarda hem de nöronlarda ekspresyon görüyorsunuz. Bu güçlendirici elemana, hangi tip regülatör proteinin bağlanmasını beklersiniz?

11. Bir transkripsiyon faktörünün, kas ve karaciğer hücrelerinde farklı DNA dizilerine bağlanarak, transkripsiyonu aktive ettiği bulunmuş. Aktivatör fonksiyonun bu doku özgüllüğünü belirlemede, alternatif kesip-ekleme nasıl yer alabilir?

12. Yalıtıcıların işlevleri nelerdir?

13. Kadınlarda X kromozomu inaktivasyonunun mekanizmasını açıklayın.

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Prokaryotlarda Transkripsiyon

Busby, S. and R. H. Ebright. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79: 743-746. [R]

Darst, S. A. 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11:155-162. [R]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:1891-1899. [P]

Hochschild, A. and S. L. Dove. 1998. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell* 92: 597-600. [R]

Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-356. [P]

Lewis, M., G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kirchner, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan and P. Lu. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271:1247-1254. [P]

Murakami, K. S., S. Masuda and S. A. Darst. 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296: 1280-1284. [P]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. *Genes and Signals.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Uptain, S. M., C. M. Kane and M. J. Chamberlin. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 66:117-172. [R]

Vassylyev, D. G., S. Sekine, O. Laptenko,J. Lee, M. N. Vassylyeva, S. Borukhov and S. Yokoyama. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417:712-719. [P]

Zhang, G., E. A. Campbell, E. A., L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98:811-824. [P]

Ökaryot RNA Polimerazları ve Genel Transkripsiyon Faktörleri

Butler, J. E. F. and J. T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16:2583-2592. [R]

Conaway, J. W., A. Shilatifard, A. Dvir and R. C. Conaway. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25: 375-380. [R]

Cramer, P., D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David and R. D. Kornberg. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288: 640-649. [P]

Cramer, P., D. A. Bushnell and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science* 292:1863-1876. [P]

Ebright, R. H. 2000. RNA polymerase: Structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304: 687-698. [R]

Lee, T. I. and R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 34: 77-137. [R]

Matsui, T, J. Segall, P. A. Weil and R. G. Roeder. 1980. Multiple factors are required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255: 11992-11996. [P]

Myers, L. C. and R. D. Kornberg. 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 729-749. [R]

Naar, A. M., B. D. Lemon and R. Tjian. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 70:475-501. [R]

Nikolov, D. B., H. Chen, E. D. Halay, A. A. Usheva, K. Hisatake, D. K. Lee, R. G. Roeder and S. K. Burley. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377:119-128. [P]

Orphanides, G. and D. Reinberg. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439-451. [R]

Schramm, L. and N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16:2593-2620. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate transcription at the Ad2 majör late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469-484. [P]

Woychik, N. A. and M. Hampsey. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108:453-463. [R]

Ökaryotlarda Transkripsiyonun Düzenlenmesi

Atchison, M. L. 1988. Enhancers: Mechanisms of action and cell specificity. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4:127-153. [R]

Banerji, J., S. Rusconi and W. Schaffner. 1981. Expression of a β-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299-308.[P]

Berger, S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:142-148.[R]

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21. [R]

Brent, R. and M. Ptashne. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43:729-736. [P]

Brownell, J. E., J. Zho. T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondsun, S. Y. Roth and C. D. Allis. 1996. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851. [P]

Bustin, M. 2001. Chromatin unfolding and activation by HMGN chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26:431-437. [R]

Cohen, D. E. and J. T. Lee. 2002. X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:219-224. [R]

Conaway, J. W., A. Shilatifard, A. Dvir and R. C. Conaway. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25: 375-380.[R]

Courey, A. J. and S. Jia. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* 15: 2786-2796. [R]

Dynan, W. S. and R. Tjian. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87. [P]

Ferguson-Smith, A. C. and M. A. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293: 1086-1089. [R]

Hanna-Rose, W. and U. Hansen. 1996. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* 12: 229-234. [R]

Horn, P. J. and C. L. Peterson. 2002. Chromatin higher order folding: wrapping up transcription. *Science* 297:1824-1827. [R]

Jenuwein, T. and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080. [R]

Kadonaga, J. T. 998. Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modirving machines. *Cell* 92: 307-313. [R]

Kadonaga, J. T. and R. Tjian. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5889-5893. [P]

Lee, T. I. and R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 34: 77-137. [R]

Licht, J. D., M. J. Grossel, J. Figge and U. M. Hansen. 1990. *Drosophila Krüppel* protein is a transcriptional repressor. *Nature* 346: 76-79. rP1

Matzke, M., A. J. M. Matzke and J. M. Kooter. 2001. RNA: guiding gene silencing. *Science* 293:1080-1083. [R]

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-474. [R]

McKnight, S. L. and R. Kingsbury. 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217: 316-324. [P]

Naar, A. M., B. D. Lemon and R. Tjian. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 70:475-501. [R]

Narlikar, G. J., H.-Y. Fan and R. E. Kingston. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487. [R]

Orphanides, G. and D. Reinberg. 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407: 471-475. [R]

Pabo, C. O. and R. T. Sauer. 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095. [R]

Panning, B. and R. Jaenisch. 1998. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93: 305-308. [R]

Ptashne, M. and A. Gann. 2002. *Genes and Signals.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Richards, E. J, and S. C. R. Elgin. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108:489-500. [R]

Schreiber, S. L. and B. E. Bernstein. 2002. Signaling network model of chromatin. *Cell* 111:771-778. [R]

Staudt, L. M. and M. J. Lenardo. 1991. Immunoglobulin gene transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 9:373-398. [R]

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber. 1996. Amammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulatör Rpd3p. *Science* 272:408-411. [P]

Tilghman, S. M. 1999. The sins of the fathers and mothers: Genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96:185-193. [R]

Turner, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111: 285-291. [R]

Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hail, G. Teng, S. I. S. Grewal and R. A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lystne-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833-1837. [P]

West, A. G., M. Gaszner and G. Felsenfeld. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16: 271-288. [R]

Wolffe, A. 1998. Chromatin: *Structure and Function.* 3rd. ed. New York: Academic Press.

RNA İşlenmesi ve Dönüşümü

Abelson, J., C. R. Trotta and H. Li. 1998. tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 273:12685-12688. [R]

Baker, B. S. 1989. Sex in flies: the splice of life. *Nature* 340:521-524. [R]

Blanc, V. and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* 278: 1395-1398. [R]

Cech, T. R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Ann. Rev. Biochem.* 59:543-568. [R]

Dodson, R. E. and D. J. Shapiro. 2002. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog. Nucl. Acid Res.* 72: 129-164. [R]

Frank, D. N. and N. R. Pace. 1998. Ribonuclease P: Unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 153-180. [R]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35:849-857. [P]

Hirose, Y. and J. L. Manley. 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14:1415-1429. [R]

Hopper, A. K. and E. M. Phizicky. 2003. tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev.* 17: 162-180. [R]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19-28. [R]

Kruger, K., P. J. Grabovvski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147-157. [P]

Maas, S., A. Rich and K. Nishikura. 2003. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J. Biol. Chem.* 278:1391-1394. [R]

Madison-Antenucci, S., J. Grams and S. L. Hajduk. 2002. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell* 108: 435-138. [R]

Maniatis, T. and R. Reed. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 449-506. [R]

Maniatis, T. and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418: 236-243. [R]

Moore, M. J. 2002. Nuclear RNA turnover. *Cell* 108:431-434. [R]

Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy and P. A. Sharp. 1984. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225:898-903. [P]

Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35:101-107. [Pl

Proudfoot, N. J., A Furger and M. J. Dye. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108:501-512. [R]

Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis and M. R. Green. 1984. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro. Cell* 38:317-331. [P]

Smith, C. W. J. and J. Valcarcel. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25: 381-388.[R]

Valadkhan, S. and J. L. Manley. 2001. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* 413:701-7078. [P]

Van Hoof, A. and R. Parker. 2002. Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr. Biol.* 12: R285-R287. [R]

Villa, T., J. A. Pleiss and C. Guthrie. 2002. Spliceosomal snRNAs: Mg^{2+}-dependent chemistry at the catalytic core? *Cell* 109: 149-152. [R]

Bölüm 7

Protein Sentezi, İşlenmesi ve Regülasyonu

mRNA'nın Çevrimi (Translasyon) 281

Protein Katlanması ve İşlenmesi 298

Protein Fonksiyonunu Düzenlenmesi 309

Protein Yıkımı 313

ANAHTAR DENEY: Ribozomal RNA'nın Katalitik Rolü 288

MOLEKÜLER TIP: Antibiyotikler ve Protein Sentezi 292

TRANSKRİPSİYON VE RNA İŞLENMESİNİ (ÇEVİRİ) (TRANSLASYON), proteinlerin sentezi mRNA kalıpları tarafından yönlendirilir. Proteinler genomik DNA da kodlanan bilgilerle yönlendirilen çok sayıda işlemi gerçekleştirmede aktif rol oynarlar. Bu nedenle protein sentezi gen ekspresyonunun son aşamasıdır. Bununla birlikte, mRNA nın translasyonu fonksiyonel protein oluşumunun ilk aşamasıdır. Polipeptid zincirleri aktif formlarına çevrilmeden önce çeşitli işlenme aşamalarından geçip katlanarak uygun üç boyutlu konformasyonunu almak zorundadır. Bu işlenme aşamaları, özellikle ökaryotlarda, farklı proteinlerin hücre içinde ayrılıp uygun hedeflere varması ile yakından ilişkilidir.

Genlerin büyük bir kısmının ifade bulması primer olarak transkripsiyon aşamasında kontrol edilmekle birlikte (bkz. Bölüm 6) gen ifadesi translasyon düzeyinde de kontrol edilmektedir ve bu kontrol hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde regülasyonun önemli bir elementidir. Bunun da ötesinde hücrede protein aktivitelerini kontrol eden mekanizmalar büyük önem taşımaktadır. Proteinlerin çoğu sentez edildikten sonra hücre dışından gelen sinyallere cevap olarak kovalent modifikasyonla veya diğer moleküllere bağlanarak kontrol edilebilirler. İlave olarak hücre içinde proteinlerin düzeyi protein yıkımının farklı hızları ile de kontrol edilebilmektedir. Hücre içi proteinlerin miktar ve aktivitelerinin çok yönlü kontrolu sonunda hücre davranışını tüm yönleri ile düzenler.

mRNA'nın Çevrimi (Translasyon)

Proteinler evrim boyunca iyi korunmuş bir süreçle mRNA kalıplarından sentezlenirler (Bölüm 3'de gözden geçirildi). Tüm mRNA'lar 5' den 3' yönüne doğru okunurlar ve polipeptid zincirleri de amino ucundan karboksil ucuna doğru sentezlenirler. Her amino asit mRNA'da hemen hemen evrensel olan bir genetik koda göre üç baz tarafından (kodon) belirlenir. Protein sentezinin temel mekanizmaları da tüm hücrelerde aynıdır: Translasyon, tRNAnın mRNA ve proteine katılan amino asitler arasında adaptör rol oynaması ile ribozomlarda

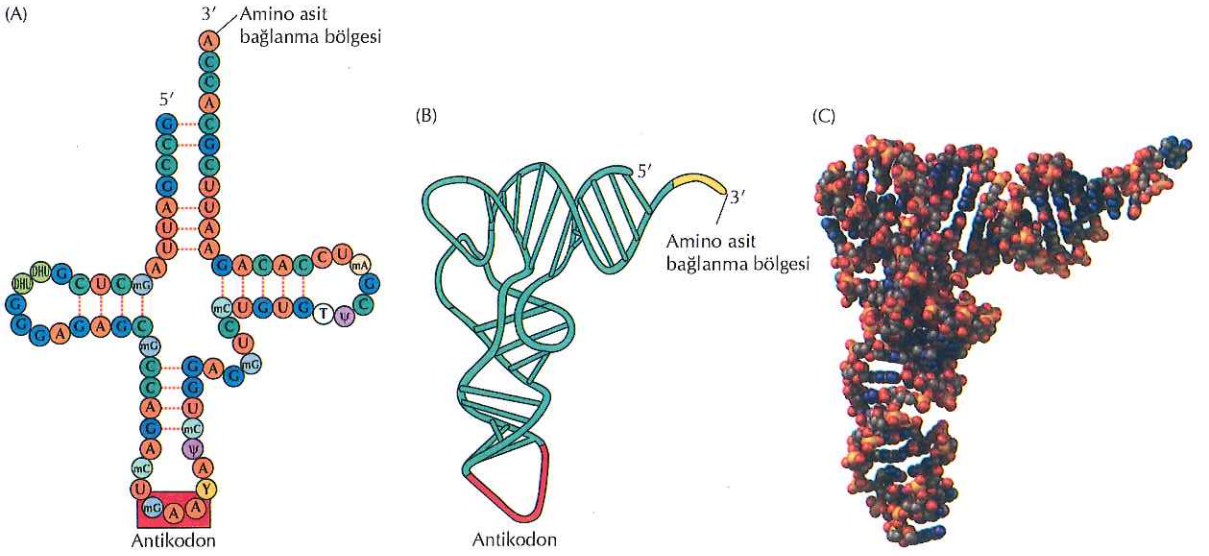
gerçekleşir. Böylece protein sentezi, translasyon için gerekli olan proteinlerin etkileşimi kadar üç tip RNA molekülü (mRNA kalıbı, tRNA ve rRNA) arasındaki etkileşimi de içerir.

Taşıyıcı RNA'lar

Translasyon sırasında 20 amino asidin her birinin mRNA da bunlara karşı gelen kodonlara göre dizilmeleri gerekir. Tüm hücreler bu süreç için adaptör rolü oynayan çeşitli **tRNA**'ları bulundururlar. Tahmin edileceği gibi protein sentezindeki genel fonksiyonlarına uygun olarak farklı tRNA'lar benzer yapıya sahiptirler. Bununla birlikte, doğru amino asidin bağlanmasını ve mRNA'daki uygun kodonlara dizilmesini sağlayacak kendine özgü tanımlayıcı diziler de içerir.

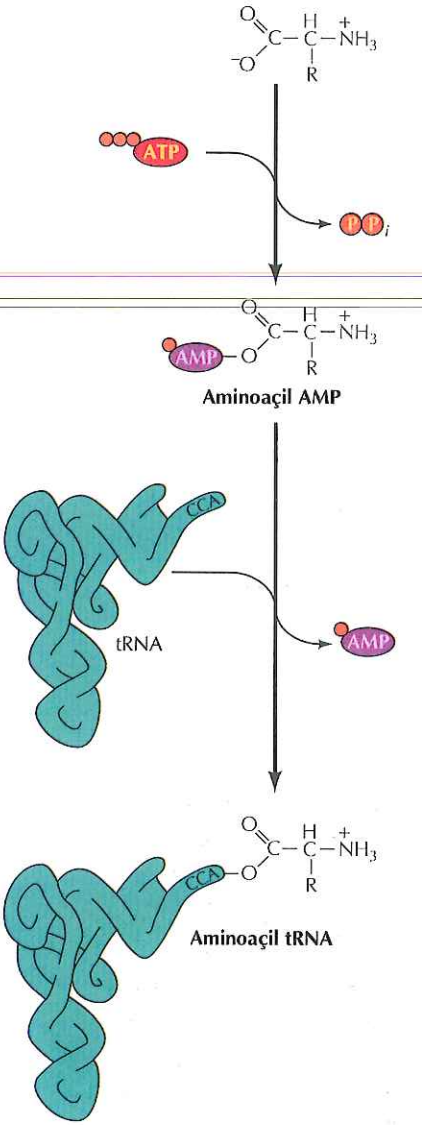
Taşıyıcı RNA'lar yaklaşık 70 ila 80 nükleotid uzunluğundadır ve molekül içinde farklı bölgeler arasındaki komplementer baz eşleşmesi ile ortaya çıkan karakteristik yonca yaprağı yapısına sahiptir (Şekil 7.1). X–ışını kristallografisi çalışmaları tüm tRNA ların, daha sonra, translasyon sürecinde ribozomlara uygun yerleşim için gerekli olan L-şeklinde bir katlanma yaptığını göstermiştir. tRNA'nın adaptör fonksiyonu molekülün birbirinden uzak iki bölgesini içerir. Tüm tRNA'ların 3' ucunda CCA dizini bulunur ve amino asitler terminal adenozinin ribozuna kovalent olarak bağlanırlar. Daha sonra mRNA kalıbı katlanmış tRNA'nın diğer ucunda yer alan ve uygun kodona tamamlayıcı baz eşleşmesi ile bağlanan **antikodon** halkası tarafından tanınır.

Doğru kodlanmış bir amino asidin proteine katılımı kodon–antikodon baz eşleşmesinin özgüllüğü kadar, her amino asidin uygun tRNA'ya eklenmesine de bağlıdır. Amino asitlerin özgül tRNA'lara bağlanması, 1957 yılında Mahlon Hoagland ve Paul Zamecnik tarafından keşfedilen ve **aminoaçil tRNA sentetaz** adı verilen bir grup enzim aracılığı ile gerçekleşir. Bu enzimlerin her biri amino asitlerin bağlanması gereken doğru tRNA'yı (veya tRNA'ları) tanıdığı gibi, tek bir amino asidi tanır. Reaksiyon iki aşamada ilerler (Şekil 7.2). İlk olarak, amino asit, aminoaçil AMP sentetaz ara ürünü vermek üzere ATP ile reaksiyona girer ve aktive olur. Aktive olmuş amino asit daha sonra tRNA'nın 3' ucuna bağlanır. Aminoaçil tRNA sentetaz, hem amino asidi hem de doğru tRNA'ları belirleyen, özgül



Şekil 7.1 tRNA'ların yapısı
Maya fenil alanin tRNA'sının açık "yonca yaprağı" şeklinde tamamlayıcı baz eşleşmesi görülmekte (A). Modifiye bazlar; mG, metil guanozin; mC, metil sitozin; DHU, dihidroüridin; T, ribotimin; Y, modifiye bir pürin (genellikle adenozin) ve ψ psödoüridini simgelemektedir. Molekülün katlanmış hali (B)'de ve üç boyutlu modeli de (C)'de görülmektedir. (C, Dan Richardson'un izni ile kullanılmıştır)

Şekil 7.2 Amino asitlerin tRNA'ya takılması
Reaksiyonun ilk aşamasında amino asitler aminoaçil AMP ara bileşiğini vermek üzere AMP ile birleşir. İkinci aşamada amino asit, alıcı tRNA'nın 3'CCA ucuna transfer olur ve AMP serbest kalır. Reaksiyonun her iki aşaması da, aminoaçil tRNA sentetaz tarafından katalizlenir.



dizileri tanıyan çok seçici bir enzim olmak zorundadır. Bazı durumlarda, amino asitlerin yüksek doğrulukta tanınması, yanlış oluşmuş aminoaçil AMP'ların reaksiyonun ikinci aşaması olan tRNA'ya bağlanmak yerine hidrolize edilmesi şeklinde işleyen, yanlışını düzeltme (proofreading) fonksiyonunun sonucudur. Doğru tRNA'nın aminoaçil tRNA sentetaz tarafından tanınması da oldukça seçicidir; sentetaz her tRNA türünü belirleyen özgül nükleotid dizilerini (çoğu kez antikodon da dahil olmak üzere) tanır.

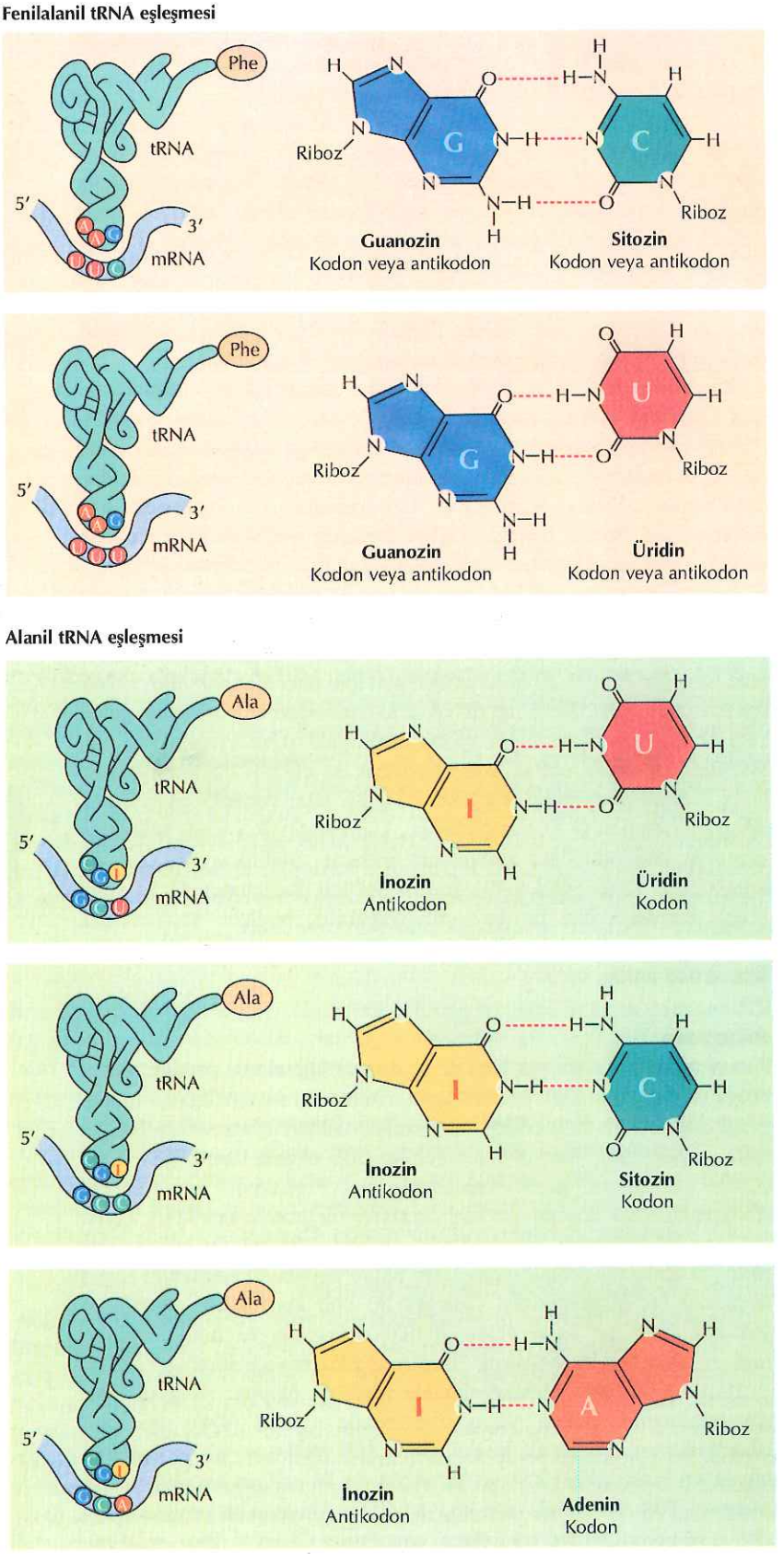
Bir amino asit tRNA'ya bağlandıktan sonra mRNA kodonu ile tRNA'nın anti kodonu arasında komplementer baz eşleşmesi ile kalıp mRNA üzerine bağlanırlar. Kodon – antikodon baz eşleşmesi daha önceki bölümlerde sözü edilen standart A–U ve G–C baz çiftlerinden daha zayıftır. Kodon – antikodon tanımasındaki bu alışılmadık baz eşleşmesinin önemi genetik kodun fazlalığı ile ilgilidir. Olası 64 kodonun üçü translasyonun bitiş sinyali olan dur kodonudur, geri kalan 61 kodon amino asit belirler (bkz. Tablo 3.1). Böylece, amino asitlerin büyük bölümü birden fazla kodon tarafından tanımlanır. Bu fazlalık birçok amino asidin birden fazla tRNA türüne bağlanmasına neden olur. Örneğin *E. coli*, 20 farklı amino asit için alıcı olan 40 farklı tRNA içerir. Ayrıca, bazı tRNA'lar, tRNA'daki antikodon ve buna karşı gelen bazı kodonların üçüncü pozisyonu arasındaki standart olmayan baz eşleşmesi (Wobble olarak bilinir) nedeni ile mRNA üzerinde birden fazla kodonu tanıyabilirler (Şekil 7.3). Bu pozisyondaki gevşek baz eşleşmesi kısmen G–U baz çiftinden, kısmen de, tRNA'nın işlenmesi sırasında antikodondaki guanozinin inozine modifikasyonu sonucu ortaya çıkar (bkz. Şekil 6.40). İnozin üçüncü pozisyonda C, U, veya A'den herhangi biri ile baz çifti yapabilir, böylece antikodonda bulunması halinde tek bir tRNA'nın mRNA kalıbında 3 farklı kodonu tanımasına imkan verir.

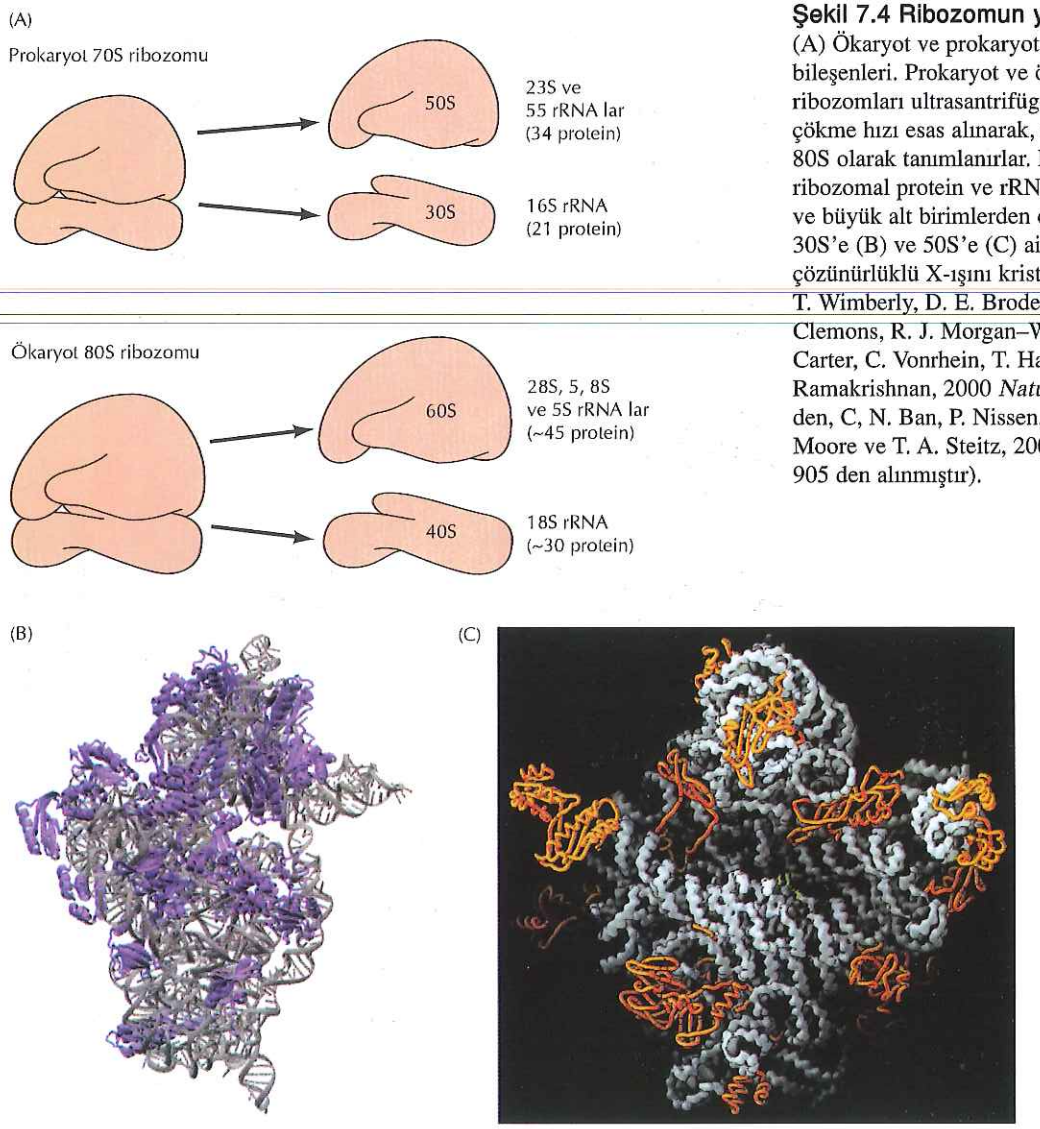
Ribozom

Ribozomlar hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde protein sentez bölgeleridir. İlk kez hücre özütlerinin ultrasantrifügasyonunda partiküller olarak fark edilen ribozomlar; bakteri ribozomları 70S ve daha büyük olan ökaryot hücredekiler 80S olmak üzere, genellikle çökme hızlarına göre adlandırılırlar. Prokaryot ve ökaryot ribozomların her ikisi de, her biri karakteristik protein ve **rRNA** içeren iki ayrı alt birimden oluşmaktadır. Aslında, hücrelerin çok sayıda ribozom içermesi protein sentezinin hücre metabolizmasındaki temel öneminin bir göstergesidir. Örneğin, *E. coli* kuru hücre ağırlığının yaklaşık %25'ine karşı gelen 20,000 dolayında ve hızlı büyüyen memeli hücreleri ise, yaklaşık 10 milyon ribozom içerirler.

Bazı ayrıntılarda farklar olmakla birlikte, ökaryot ve prokaryot ribozomlarının genel yapısı benzerdir (Şekil 7.4). *E. coli* ribozomlarının küçük alt birimi (30S) 16S rRNA ve 21 proteinden; büyük alt birim (50S) 23S ve 5S rRNA ile 34 proteinden oluşur. Her ribozom, 50S alt birimde dört kopya halinde bulunan bir protein hariç, rRNA ve proteinlerden tek kopya bulundurur. Ökaryot ribozomlarının

Şekil 7.3 Standart dışı kodon – antikodon baz eşleşmesi
Kodonun üçüncü pozisyonundaki baz eşleşmesi gevşektir, G'nin U ile, antikodondaki inozinin (I) U, C veya A ile baz çifti oluşturmasına imkan verir. Fenil alanin tRNA'sının UUC veya UUU ve alanil tRNA'sının GCU, GCC veya GCA'yı tanıması anormal baz eşleşmesine iki örnek olarak verilmiştir.

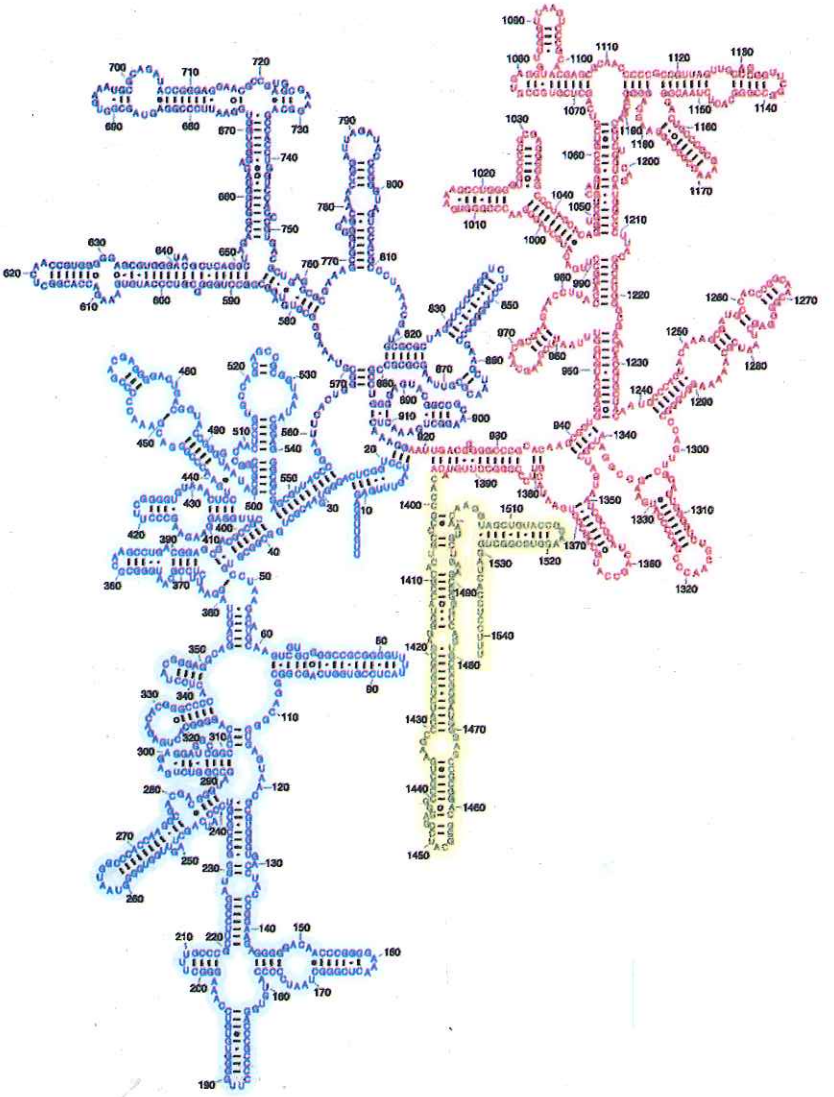




Şekil 7.4 Ribozomun yapısı
(A) Ökaryot ve prokaryot ribozomların bileşenleri. Prokaryot ve ökaryot ribozomları ultrasantrifügasyondaki çökme hızı esas alınarak, sırasıyla 70S ve 80S olarak tanımlanırlar. Her ikisi de ribozomal protein ve rRNA içeren küçük ve büyük alt birimlerden oluşurlar. (B-C) 30S'e (B) ve 50S'e (C) ait yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapı. (B, B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan–Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartrsch ve V. Ramakrishnan, 2000 *Nature* 407: 327. den, C, N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore ve T. A. Steitz, 2000. *Science* 289: 905 den alınmıştır).

alt birimleri prokaryotlardaki karşılıklarına göre daha büyüktür ve daha fazla protein içerirler. Ökaryot ribozomların küçük alt birimi (40S) 18S rRNA ve yaklaşık 30 proteinden, büyük alt birim (60S) 28S, 5.8S ve 5S rRNA ile yaklaşık 45 proteinden oluşmaktadır. Boyutlarının büyüklüğü ve karmaşıklıklarından dolayı, ribozomların X–ışını kristallografisi ile yüksek çözünürlükte yapısal analizleri 2000 yılında 30S ve 50S alt birim yapılarının ilk rapor edilişine kadar başarılamamıştır. Aşağıda tartışıldığı gibi, ribozomların yapısının atomik düzeyde anlaşılmasının ribozomların fonksiyonunu anlamamızda büyük etkisi olmuştur.

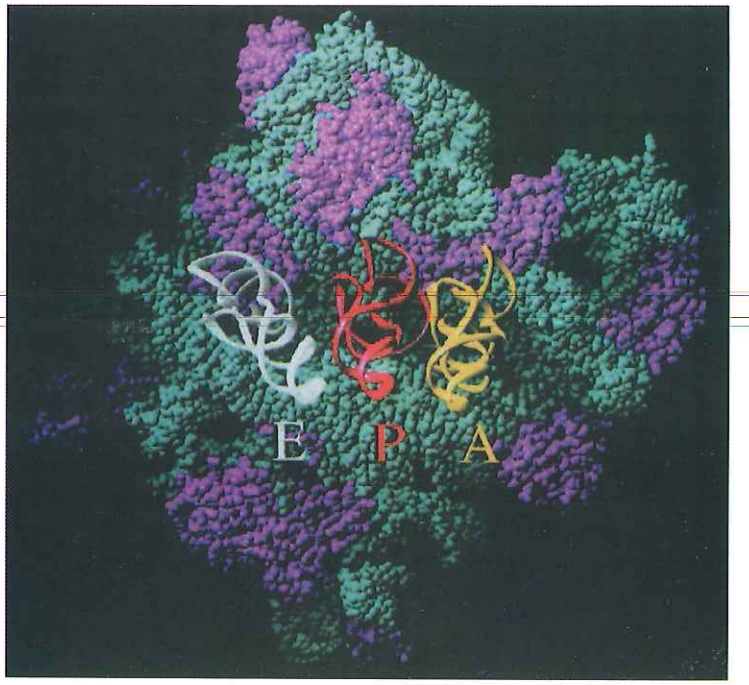
Ribozomların önemli bir özelliği, *in vitro* koşullarda RNA ve protein bileşenlerinin kendiliğinden bir araya gelmesiyle yeniden oluşabilmeleridir. 1968 yılında ilk kez Masayasu Nomura tarafından tanımlandığı gibi, saflaştırılmış ribozomal proteinler ve rRNA'lar uygun şartlar altında bir arada karıştırıldığı zaman fonksiyonel ribozom tekrar oluşmaktadır. Ribozomun montajı *in vivo* koşulda



Şekil 7.5 16S rRNA'nın yapısı
Komplementer baz eşleşmesi, kendine özgü sekonder yapısını oluşturur. (M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. H. Earnest, J. H. D. Cate and H. F. Noller, 2001. *Science* 292: 883'den)

(özellikle ökaryot hücrelerde) çok daha karmaşık olmakla birlikte, *in vitro* olarak ribozomların kendiliğinden yapılanması rRNA ve her bir proteinin rolünü analiz etmeye olanak sağlayan bir deneysel araç olmuştur.

tRNA'lar gibi rRNA'lar da komplementer baz eşleşmesi ile kendilerine özgü sekonder yapı oluştururlar (Şekil 7.5). Daha sonra rRNA'lar ribozomal proteinlerle birlikte daha ileri üç boyutlu yapılarına katlanırlar. Başlangıçta, rRNA'ların sadece ribozomal proteinlerin bir araya gelmesi için iskelet oluşturarak yapısal rol oynadığı düşünüldü. Bununla birlikte diğer RNA moleküllerinin katalitik aktivitelerinin (örnek olarak; RNaz P ve kendi kendini uzaklaştıran intronlar Bölüm 6'da tartışıldı) keşfedilmesi ile rRNA'ların da olası katalitik rolü düşünülmüştür. Bu hipotezle uyumlu olarak, fonksiyonel ribozomların *in vitro* koşulda yapılanması için rRNA'ların kesinlikle gerekli olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan bazı proteinlerin çıkarılması ribozom aktivitelerini düşürmüş ancak tamamen yok etmemiştir.



Şekil 7.6 50S Ribozomal alt birimin yapısı
A, P ve E bölgelerine 3 tRNA bağlanmış bir bir ribozomun 50S alt birimine ait, yüksek çözünürlüklü model (bkz. Şekil 7.12). Ribozomal proteinler pembe ve rRNA mavi olarak görülmektedir. (P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz 2000. *Science* 289: 920 den alındı).

Ribozomal RNA'ların katalitik aktiviteleri ile ilgili ilk kanıt, 1992 yılında Harry Noller ve arkadaşlarının deneylerinden geldi. Bu araştırmacılar büyük ribozomal alt birimde standart protein izolasyonu işlemleri ile ribozomal proteinlerin yaklaşık %90'ının uzaklaştırılması halinde bile peptid bağı oluşumunun (peptidil transferaz reaksiyonu) katalizlenebildiğini gösterdiler. Bunun aksine, RNaz muamelesinin peptid bağı oluşumunu tamamen yok etmesi peptid bağı oluşumunun RNA tarafından katalizlenen bir reaksiyon olduğu hipotezine güçlü bir destek sağladı. Ancak, bazı ribozomal proteinler RNA'yı bozmadan uzaklaştırılamadıklarından, ribozomal proteinlerin peptid bağı oluşumunda katalizleyici olma olasılığı tamamen yok edemedi.

Protein sentezinin rRNA tarafından katalizlendiği konusunda şüphe götürmez bir kanıt, 2000 yılında Peter Moore, Thomas Seitz ve arkadaşları tarafından bildirilen, 50S ribozomal alt biriminin yüksek çözünürlüklü yapısal analizlerinden elde edildi (Şekil 7.6). Ribozom yapısının atom düzeyindeki görüntüsü, peptidil transferaz reaksiyonunun gerçekleştiği bölgede ribozomal proteinlerin kesinlikle bulunmadığını ve peptid bağı oluşumunun katalizinden rRNA'nın sorumlu olduğunu açıkca gösterdi. Yapısal analizler serin proteazlar tarafından yapılan peptid bağı hidrolizi reaksiyonunun tersine benzer bir şekilde aktif bölgedeki rRNA'ların da proton transfer reaksiyonu ile peptid bağı oluşumunu katalizleyebileceğini düşündürmektedir (bkz. Şekil 2.26). İleri sürülen bu mekanizmanın doğruluğunun saptanması için daha ileri çalışmalar gerekmekle birlikte, protein sentezinin temel reaksiyonunun ribozomal RNA tarafından katalizlendiği fikri iyice yerleşmiştir. Ribozomların primer katalitik birimi olması gereken ribozomal proteinlerin ise, büyük ölçüde yapısal rol oynadığı düşünülmektedir.

Ribozomal RNA'nın peptidil transferaz reaksiyonuna doğrudan katılmasının çok önemli evrimsel sonuçları da vardır. RNA'nın kendini kopyalayabilen ilk makromolekül olduğu düşünülmektedir (bkz. Bölüm 1). Bu kavram, RNA sübstratlarının söz konusu olduğu

ANAHTAR DENEY

Ribozomal RNA'nın Katalitik Rolü

Unusual Resistance of Peptidyl Transferase to Protein Extraction Procedures

Harry F. Noller, Vernita Hoffarth, and Ludwika Zimniak
University of California at Santa Cruz

Science, Volume 256, 1992, pages 1416 – 1419

Bağlam

Ribozomların protein sentezindeki rolü 1960 larda açıklanmıştır. Bu dönemde ribozomlar protein ve RNA'dan oluşan partiküller olarak tanımlanmış ve saflaştırılmış alt birimlerden fonksiyonel ribozomların tekrar oluşumu gerçekleştirilmiştir. Bu yıllarda genellikle peptid bağı oluşumunun (peptidil transferaz reaksiyonu) ribozom yapısındaki rolünü de destekleyecek şekilde rRNA öncülüğünde ribozomal proteinler tarafından katalizlendiği kabul ediliyordu. Bununla birlikte, daha 1970'lerde protein sentezinde rRNA nın daha doğrudan bir rol oynayacağını destekleyen deliller gelmeğe başladı. Örneğin ribozomal proteinlerden birçoğunun ribozom fonksiyonu için vazgeçilmez olmadığı bulundu. Bunun aksine, rRNA'nın bazı kısımlarındaki dizilerin evrim boyunca çok korunmuş olduğunun gösterilmesi rRNA molekülünün bu kısımlarının kritik fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir.

1980'lerin başında RNA nın katalitik aktivitesi Sidney Altman'ın RNaz P ve Tom Cech'in *Tetrahymena*'da ribozim çalışmaları ile kabul edildi. RNA katalizi ile ilgili bu keşifler rRNA'nın peptid bağı oluşumunun katalizine doğrudan katıldığı hipotezine de örnek oluşturdu. rRNA'nın bu rolünü destekleyen en güçlü kanıt 1992'de Harry Noller ve arkadaşlarının yayınından geldi.

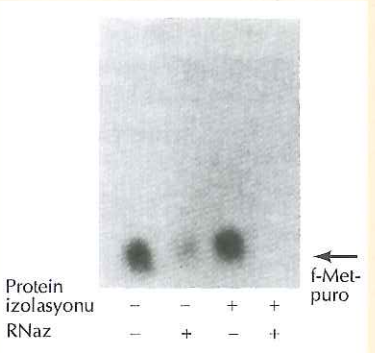
Deneyler

Noller ve arkadaşları rRNA'nın katalitik aktivitesini çalışmak için peptidil transferaz aktivitesini test etmek üzere basit bir model reaksiyon kullandılar. Bu reaksiyon, radyoaktif işaretli N-formilmetioninin, bir tRNA fragmanından, aminoaçil tRNA'ya benzeyen ve uzamakta olan polipeptid zinciri ile peptid bağı oluşturan bir antibiyotik olan puromisinin amino grubuna transferini ölçmekteydi. Bu peptidil transferaz model reaksiyonunun avantajı küçük ribozomal alt birim, diğer protein faktörler ve mRNA gerekmeksizin izole edilmiş 50S ribozomal alt birim ile yapılıyor olmasıdır.

Araştırıcılar daha sonra ribozomal proteinleri standart protein izolasyon işlemleri ile uzaklaştırarak 50S alt biriminin peptidil transferaz aktivitesini test ettiler. Deneylerin önemli bir yönü de ribozomların *Thermus aquaticus* bakterisinden kullanılmasıdır. Bu bakteri yüksek sıcaklıkta yaşadığından, rRNA'ların yapısının *E. coli* rRNA'larından daha dayanıklı olduğu düşünüldü. *T. aquaticus* ribozomlarının peptidil transferaz aktivitesinin fenol, proteazlar ve deterjan gibi güçlü izolasyon işlemlerine tamamen

Harry F. Noller

dirençli olması da eleştiriye açık bir sonuçtur (şekle bakınız). En çarpıcı olanı da ribozomal proteinlerin %90'ını uzaklaştıran izolasyon işlemlerinin tekrarlanmasına rağmen tüm peptidil transferaz aktivitesinin devam etmesidir. Buna karşılık izole edilmiş veya tüm ribozomların peptidil transferazları çok kısa bile olsa RNaz muamelesine aşırı duyarlıdır. Her ne kadar bu deneyler



Peptidil transferaz reaksiyonu radyoaktif N-formilmetionin-puromisin (f-met-puro) oluşumu ile test edilip elektroforez ve otoradyografi ile saptanmıştır. Daha önce belirtildiği gibi *T. aquaticus*'da ribozomlar protein ekstraksiyonu ve RNaz muamelesine maruz kalmıştır.

reaksiyonların, RNaz P ve kendini kesip çıkaran intronlar gibi ribozimler tarafından katalizlenmesi ile güçlü bir şekilde desteklenmiştir. rRNA'nın peptid bağı oluşumundaki rolü RNA'ların katalitik aktivitesini, kendini eşlemekten protein sentezine doğrudan katılıma kadar genişletmiştir. İzleyen çalışmaların, *Tetrahymena* rRNA ribozominin amino asitlerin RNA'ya bağlanmasını da

olası ribozomal protein kalıntısını engellemese de 23S rRNA'nın peptidil transferaz reaksiyonuna doğrudan katkısı olduğuna güçlü bir destek sağladı.

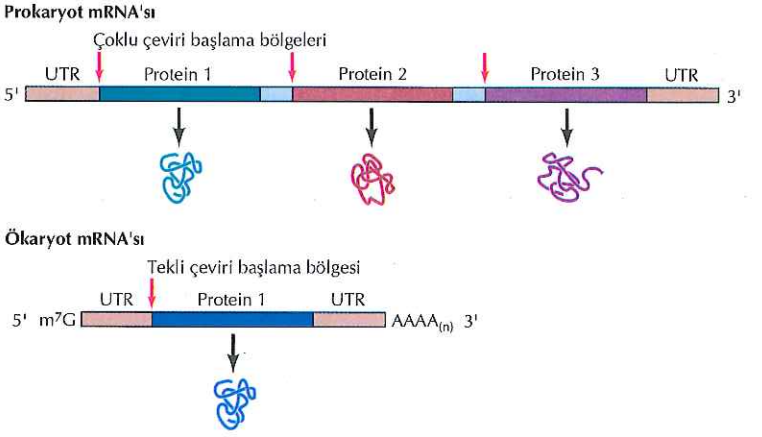
Etki

Noller'ın deneylerinin sonuçları 2000 yılında Peter Moore, Thomas Steitz ve arkadaşları tarafından 50S ribozomal alt biriminin yüksek çözünürlüklü yapısal analizleri ile kesin olarak doğrulandı. Peptidil transferaz reaksiyonunun gerçekleştiği ribozom bölgesi sadece rRNA içerir ve etrafında hiç ribozomal protein bulundurmaz. Bu sonuçlar RNA'nın bu reaksiyondaki katalitik rolü ile ilgili tüm şüpheleri yok etti ve protein sentezinin temel reaksiyonunun ribozomal RNA tarafından katalizlendiğini gösterdi. Bu bulgular sadece bizim ribozom fonksiyonunu anlamamız üzerine değil aynı zamanda RNA molekülünün daha önceden tanımlanmış katalitik aktivitesi ve evrimin erken dönemlerinde kendini replike eden RNA molekülleri ile dolu bir RNA dünyası olduğu hipotezini de çarpıcı bir şekilde desteklemektedir. Bu hipotez daha önceden RNA moleküllerinin kendi replikasyonları için gerekli reaksiyonu katalizledikleri temeli üzerine kurulmuştur. RNA nın protein sentezinde yer alan reaksiyonları katalizleyebilmesinin keşfi RNA dünyası ile günümüz hücrelerindeki peptid bağı oluşumunda anahtar rol oynaması RNA nın hala fonksiyonuna devam etmesi ile genetik bilgi akışı arasında net bir bağ oluşturmaktadır.

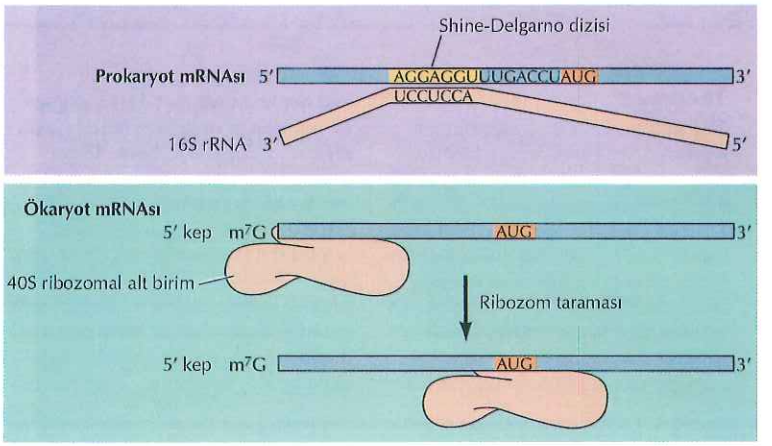
katalizleyebildiğini göstermesi, orijinal aminoaçil tRNA sentetazların protein yerine RNA'lar olma olasılığını güçlendirimiştir. RNA moleküllerinin kendilerini eşlemeleri yanıda protein sentezi için gerekli olan reaksiyonları da katalizleme yetenekleri hücrelerin evrimini anlamada önemli bir köprü oluşturmaktadır.

Mesajcı RNA'nın Organizasyonu ve Çevirinin Başlaması

Her ne kadar prokaryot ve ökaryot hücrelerde protein sentez mekanizmaları benzerse de, özellikle mRNA kalıbı üzerinde polipeptid zinciri sentezinin başladığı pozisyonu tanımlayan sinyaller gibi bazı farklar da mevcuttur (Şekil 7.7). Çeviri 5' ucunda basit bir şekilde değil özel başlama bölgelerinden başlar. Bu nedenle hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde 5' terminal kısmı, kodlamayan diziler içerir ve **proteine çevrilmeyen 5' bölgesi** olarak adlandırılır. Ökaryot mRNA'ları genellikle tek bir polipeptid zinciri kodlar ancak prokaryot mRNA'ları ayrı başlama bölgelerinden bağımsız olarak sentezlenen birçok polipeptid kodlar. Örneğin, *E. coli* Lac operonu aynı mRNA'dan proteine çevrilecek olan üç genden oluşur (bkz. Şekil



Şekil 7.7 Prokaryot ve ökaryot mRNA'ları
Prokaryot ve ökaryot mRNA'larının her ikisi de, 5' ve 3' uçlarında proteine çevrilmeyen (UTR) bölgeler içerir. Ökaryot mRNA'sı aynı zamanda 5' 7-metilguanozin (m7G) kep ve 3' poli-A kuyruğu içerir. Prokaryot mRNA'ları genellikle polisistroniktir: Her biri bağımsız başlama bölgesi ile proteine çevrilen bir çok protein kodlar. Ökaryot mRNA'ları genellikle monosistroniktir, tek bir protein kodlarlar.



Şekil 7.8 Çevirinin başlama sinyalleri
Prokaryot mRNA'sında başlama bölgesi, AUG başlama kodonunun önünde yer alan Shine–Delgarno dizileri ile karakterizedir. Shine–Delgarno dizileri ve 16S rRNA'nın ucuna yakın komplementer diziler arasındaki baz eşleşmesi mRNA'yı ribozom üzerine yerleştirir. Buna karşılık, ökaryot mRNA'sı 40S ribozomal alt birime 5' 7-metilguanozin kep ile bağlanır. Daha sonra ribozom, mRNA 'yı, başlama kodonu AUG'yi buluncaya kadar tarar.

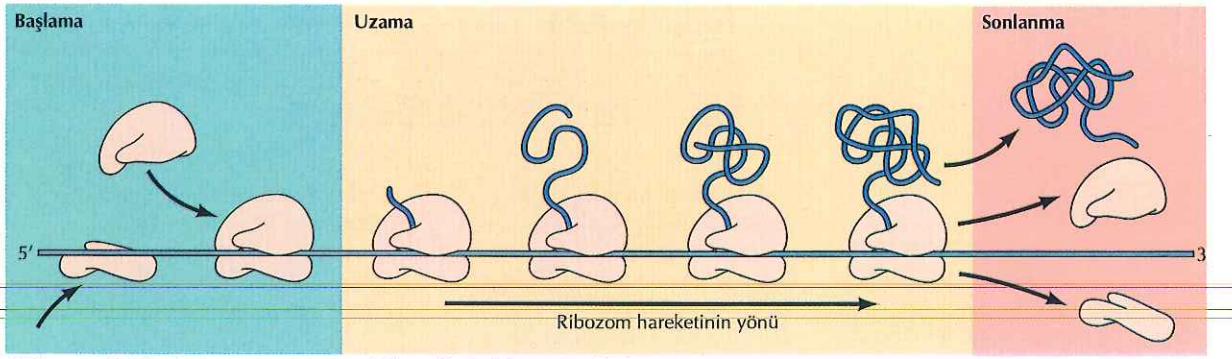
6. 9). Tek polipeptid kodlayan mRNA'lar **monosistronik**, birden fazla polipeptid kodlayan mesajcı RNA'lar ise **polisistronik** olarak adlandırılar. Hem prokaryot hem de ökaryot mRNA'lar, **proteine çevrilmeyen 3' bölgesi** ile sonlanırlar.

Hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde çeviri genellikle, daima AUG tarafından kodlanan metionin amino asidi ile başlar. GUG gibi alternatif başlama kodonları bazen bakteriler tarafından kullanılır ancak bu kodonlar polipeptid zincirinin başında oldukları zaman normalde kodladıkları amino asit yerine (GUG normalde valin kodlar) metiyonin katılımını yönlendirirler. Ökaryotlarda modifiye olmamış metiyonin protein sentezini başlatırken (ribozomları bakterininkine benzeyen mitokondri ve kloroplastlar hariç) bakterilerin çoğunda protein sentezi modifiye metionin (N- formilmetionin) ile başlar.

Monosistronik ve polisitronik mRNA'ların farklı işlevleriyle uyumlu olarak, prokaryot ve ökaryot hücrelerde başlama kodonlarını tanımlayan sinyaller de farklıdır (Şekil 7.8). Bakterilerde başlama kodonlarından önce, 16S rRNA'nın 3' ucuna yakın komplementer dizilerle baz çifti oluşturarak mRNA'yı çeviri için ribozomlar üzerine yerleştiren özgül diziler (bulanların adıyla **Shine – Delgarno dizileri** olarak adlandırıldılar) yer alırlar. Bu baz eşleşmesi ilişkisi sadece mRNA'nın 5' ucunda değil aynı zamanda polisistronik mesajlardaki internal başlama bölgelerinde de bakteri ribozomlarının çevriyi başlatmasına olanak verir. Bunun aksine ribozomlar ökaryot mRNA'yı 5' ucundaki 7–metilguanozin 'kep' bölgesine bağlanarak tanırlar (bkz. Şekil 6.41). Daha sonra, ribozomlar 5' kep bölgesinden aşağıya doğru AUG kodonunu buluncaya kadar tararlar. AUG etrafındaki diziler başlama kodunun etkinliğini değiştirebilir, bazı durumlarda mRNA'daki ilk AUG kodonu atlanır ve çeviri daha ilerideki AUG den başlar. mRNA üzerinde, içeride bir pozisyonda, ribozomun bağlanarak çeviriyi başlatacağı internal ribozom giriş bölgelerinin çeşitli viral ve bazı hücresel RNA'larda da bulunduğu hatırda tutulmalıdır. Bunula birlikte, ökaryot mRNA'ların çoğunun çevrimi, tek bir polipeptid kodlayan monosistronik mesajla uyumlu olarak 5' ucu taranarak başlatılır.

Çeviri Süreci

Proteine çevrim (translasyon) genellikle; başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (Şekil 7.9). Hem prokaryot hem de ökaryotlarda başlamanın ilk aşaması mRNA'nın ve özgül başlatıcı



Şekil 7.9 Çeviriye genel bakış

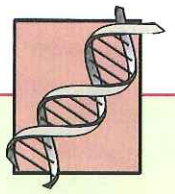
metionil tRNA'nın küçük ribozomal alt birime bağlanmasıdır. Daha sonra polipeptid zincirinin uzamasının devam edeceği fonksiyonel ribozomu oluşturacak büyük ribozomal alt birim bu komplekse katılır. Translasyon sürecenin çeşitli aşamalarında çok sayıda özgül ribozomal olmayan proteinlere de gereksinim duyulur (Tablo 7.1).

Bakteride translasyonun ilk aşaması, üç **başlama faktörünün** (IF-1, IF-2, IF-3) 30S ribozomal alt birime bağlanmasıdır (Şekil 7.10). Daha sonra mRNA ve N-formilmetionil tRNA, özgül olarak başlatıcı tRNA'yı tanıyan IF-2 (GTP'ye bağlanır) ile komplekse katılır. Daha sonra 50S ribozomal alt birimin kompleksle birleşmesine olanak vermek üzere, IF-3 ayrılır. Bu birliktelik, IF-2'ye bağlı GTP'nin hidrolizini tetikleyerek, IF-1 ve IF-2'nin (GDP bağlı) serbestleşmesini sağlar. Bunun sonucu, translasyonun uzama aşamasında peptid bağı oluşumunun başlamasına hazır olan 70S (ribozoma mRNA ve başlatıcı tRNA bağlanmış) başlama kompleksidir.

Ökaryotlardaki başlama aşaması çok daha karmaşıktır ve eIF'ler (ökaryot başlama faktörleri; bkz. Tablo 7.1) olarak belirtilen en az on proteine (her biri çoklu polipeptid zincirinden oluşur) gereksinim duyarlar. eIF-1, eIF-1A, eIF-3 ve eIF-5 faktörleri 40S ribozomal alt birime bağlanır ve eIF-2 (GTP ile kompleks halinde) başlatıcı metionil tRNA ile ilişki kurar (Şekil 7.11). Mesajcı RNA eIF-4 grubu tarafından tanınır ve ribozoma götürülür. mRNA'nın 5' kep kısmı ise, eIF-4E tarafından tanınır. Diğer bir faktör eIF-4G, hem mRNA'nın 3' ucundaki poli A kuyruğuna bağlı olan bir proteine (poly A bağlanan protein veya PABP) hem de eIF- 4E ye bağlanır. Böylece ökaryot başlama faktörleri mRNA'nın 3' ve 5' olmak üzere her iki ucunu da

TABLO 7.1 Çeviri Faktörleri

Rolleri	Prokaryotlarda	Ökaryotlarda
Başlama	IF-1, IF-2, IF-3	eIF-1, eIF-1A, eIF-2 eIF-2B, eIF-3, eIF-4A eIF-4b, eIF-4E, eIF-4G, eIF-5
Uzama	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF-1α, eEF-1$\beta\gamma$, eEF-2
Sonlanma	RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3



MOLEKÜLER TIP

Antibiyotikler ve Protein Sentezi

Hastalık

Tüberküloz, bakteriyel pnömoni, çocukluk çağı menenjiti, yara ve yanıkların enfeksiyonu, frengi ve gonorenin da dahil olduğu çok sayıda öldürücü olabilen enfeksiyonlardan bakteriler sorumludur. 1940'lardan önce hekimlerin, bu bakteri enfeksiyonları için etkin olan hiçbir tedavileri mevcut değildi. Bu dönemde, klinikte ilk antibiyotik kullanımı gerçekleştirildi. Daha önceden tedavi edilemeyen enfeksiyonlar tedavi edilir hale geldi ve ortalama insan ömrünün önemli ölçüde uzamasının nedeni olarak, antibiyotiklerin klinik uygulamaya girmesi gösterildi. Bu gün, bakteri enfeksiyonlarının etkin tedavisine imkan veren yüzden fazla antibiyotik kullanılmaktadır.

Moleküler ve Hücresel Temel

Bir antibiyotiğin klinik olarak etkin olabilmesi için, insanlara toksik olmadan bakterileri öldürmesi veya çoğalmalarını durdurması gerekir. Böylece, klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğu bakteride bulunan, ancak insan hücrelerinde olmayan hedeflere yönlendirir. Örneğin, penisilin bakteri duvar sentezini inhibe eder (bkz. Bölüm 12). Bununla birlikte, genelde kullanılan antibiyotiklerin çoğu protein sentezinin farklı aşamalarını inhibe eder (tabloya bakınız). Streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisin de dahil olmak üzere, bu antibiyotikler prokaryot ribozomlara özgüldür ve bu nedenle bakteri enfeksiyonlarını tedavide etkin ajanlardır. Diğer antibiyotikler ise (puromisin gibi), hem prokaryot hem de ökaryot veya sadece ökaryot (siklohekzimid) protein sentezine etkilidir. Her ne kadar bu antibiyotikler klinik kullanıma uygun değilse de, hem ökaryot hem de prokaryot hücrelerde protein sentezini çalışmak için uygun birer araçtırlar.

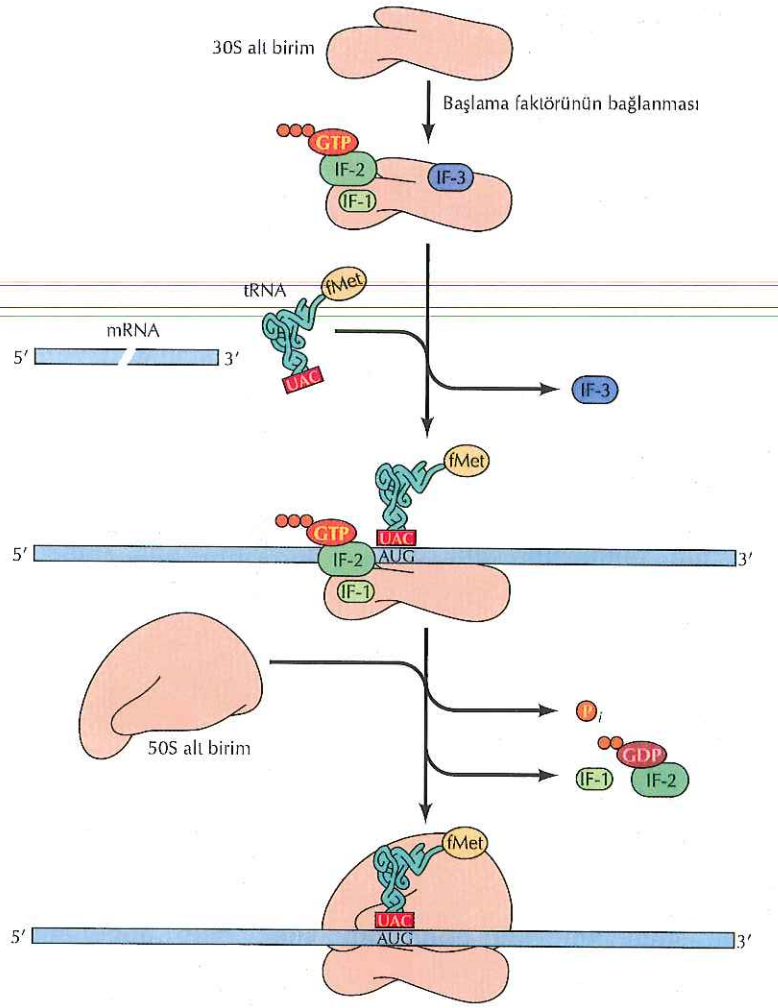
Protein Sentezinin Antibiyotik İnhibitörleri

Antibiyotik	Hedef hücre	Etki
Streptomisin	Prokaryot	Başlamayı inhibe eder ve yanlış okunmaya neden olur
Tetrasiklin	Prokaryot	Aminoaçil tRNA ların bağlanmasını inhibe eder
Kloramfenikol	Prokaryot	Peptidil transferaz aktivitesini inhibe eder
Eritromisin	Prokaryot	Translokasyou inhibe eder
Puromisin	Prokaryot ve ökaryot	Zincirin erken sonlanmasına neden olur
Siklohekzimid	Ökaryot	Peptidil transferaz aktivitesini inhibe eder

Önlem ve Tedavi

Antibiyotiklerin kullanılması, hekimlerin, hayatı tehdit eden bakteri enfeksiyonlarını tedavi etmelerine olanak verdiği için, modern tıpta büyük etkileri olmuştur. Bununla birlikte, ne yazık ki mutasyonlar antibiyotiklere dirençli bakteri suşlarının gelişmesine yol açmıştır. Bakteri suşlarının çoğu bir veya birkaç antibiyotiğe dirençlidir. Bu nedenle hekimler bazen etkin bir antibiyotik bulmak için birkaç antibiyotik kullanmak zorunda kalırlar. Bunun da ötesinde, dirençli bakteri suşlarının yayılması ile, bazı antibiyotikler kullanılmaz hale gelmiştir. En ciddi olanı da, birden fazla antibiyotiğe dirençli olan bakteriler ortaya çıkmıştır ve genellikle hastanelerde bazı bakteri suşları birkaç antibiyotik hariç tüm antibiyotiklere direnç geliştirmiştir. Bu çoklu direnç suşlarının ortaya çıkışının, antibiyotiğe dirençli bakterilerin yayılmasının neden olduğu tedavi edilemeyen enfeksiyonların hortlaması ile, enfeksiyon hastalıklarında antibiyotik öncesi günlere dönüleceğinin habercisi olabileceği şeklinde senaryolar gündeme gelebilir. Mevcut antibiyotiklerin kullanımını en uygun düzeye getirmek ve yeni antibiyotikler geliştirmekle antibiyotiğe dirençli bakterilerin kontrol edilmesi, şu andaki tıbbi uygulamalarda önemli bir kaygıdır.

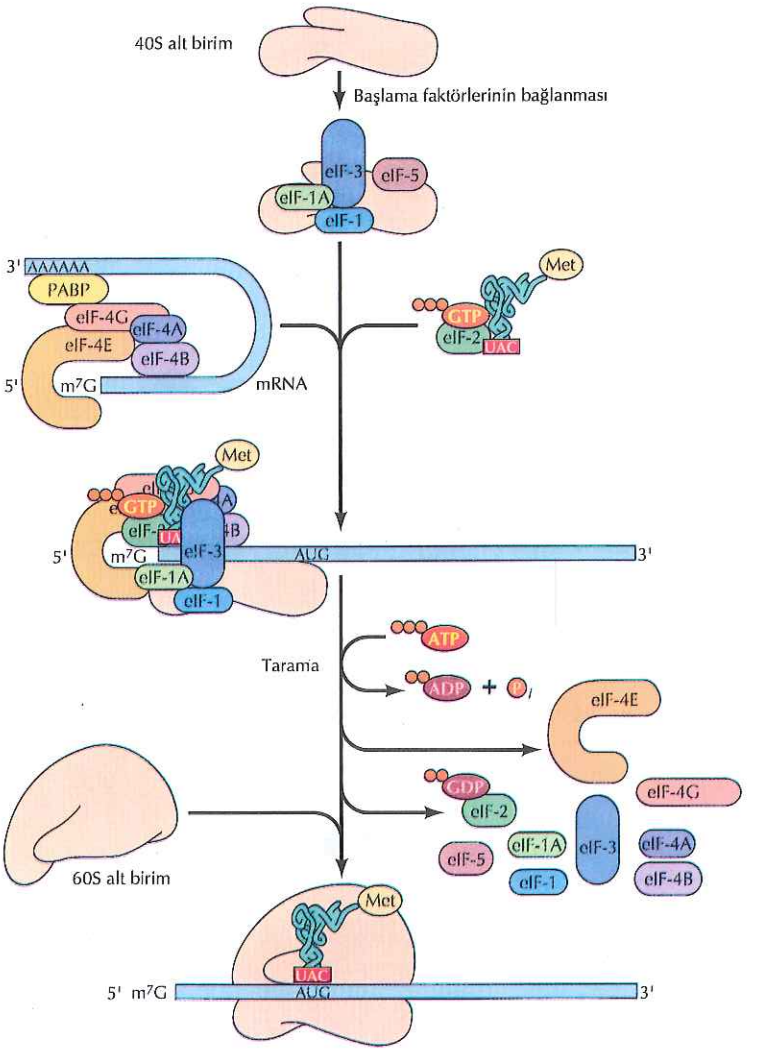
tanıyarak, poliadenilasyonun translasyona olan uyarıcı rolünü gündeme getirir. Başlama faktörleri eIF-4E ve eIF-4G, eIF-4A ve eIF-4B ile etkileşir ve daha sonra eIF-4G'nin eIF-3 etkileşimi ile mRNA'yı 40S ribozomal alt birimine getirir. 40S ribozomal alt birim üzerine bağlı olan metionil tRNA ve eIF'lerle birlikte AUG başlama kodonunu belirlemek üzere mRNA'yı tarar. AUG kodonuna ulaşıldığı zaman, eIF-5 eIF-2'ye bağlı olan GTP'nin hidrolizini tetikler. Bunun üzerine başlama faktörleri ayrılırlar (GDP'ye bağlı eIF-2 dahil) ve 60S alt birim 40S alt birime bağlanarak ökaryot hücrelerin 80S başlama kompleksini oluştururlar.



Şekil 7.10 Bakterilerde çevirinin başlaması
Önce üç başlama faktörü (IF1, IF2 ve IF3) 30S ribozomal alt birime bağlanır. Bu aşamayı, mRNA'nın ve GTP bağlı IF2 tarafından tanınan, başlangıç N-formilmetionil (fMet) tRNA' nın bağlanması takip eder. Daha sonra, IF3 ayrılır ve 50S alt birimi komplekse bağlanarak, bağlı GTP'nin hidrolizini ve GDP'ye bağlı IF1 ve IF2 nin ayrılmasını tetikler.

Başlama kompleksi oluştuktan sonra translasyon polipeptid zincirinin uzaması ile devam eder. Uzamanın mekanizması prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde benzerdir (Şekil 7.12). Ribozomda 3 tRNA bağlama bölgesi bulunur, P (peptidil), A (aminoaçil) ve E (exit) ile gösterilen çıkış bölgeleri. Başlatıcı metionil tRNA P bölgesine bağlanır. Uzama aşamasında ilk adım, bir sonraki tRNA'nın mRNA'daki ikinci kodonla eşleşerek, A bölgesine bağlanmasıdır. Aminoaçil tRNA, GTP ile bağlanmış bir **uzama faktörü** (prokaryotlarda EF-Tu, ökaryotlarda eEF-1α) tarafından ribozoma getirilir. Uzamakta olan polipeptid zincirine katılmak üzere doğru aminoaçil tRNA'nın seçilmesi, protein sentezinin doğruluğunu belirleyen kritik bir aşamadır. Her ne kadar bu seçim, mRNA'daki kodon ve tRNA'daki antikodon arasındaki baz eşleşmesine dayanırsa da, baz eşleşmesi tek başına protein sentezinin 10^{-3} den daha az olan hata oranı ile doğruluğunu sağlamakta yeterli değildir. Bu doğruluk, küçük ribozomal alt birimdeki, doğru kodon-antikodon baz eşleşmesini tanıyan ve yanlış eşleşmeleri ayıran 'deşifre merkezi' tarafından sağlanır. Doğru aminoaçil tRNA'nın A bölgesine yerleşmesi EF-Tu'ya bağlı olan GTP hidrolizini ve GDP-bağlı uzama faktörünün

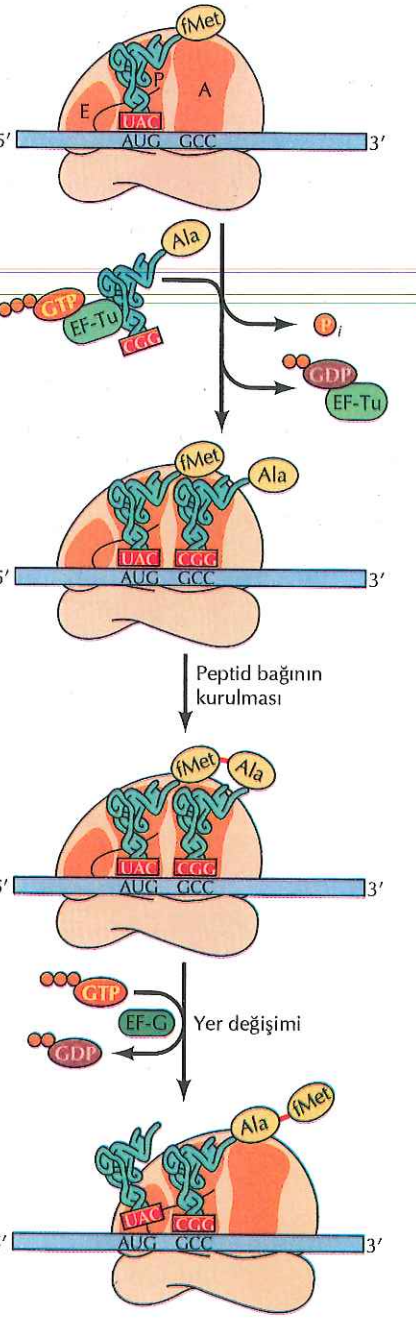
Şekil 7.11 Ökaryot hücrelerinde çevirinin başlaması
Başlama faktörleri eIF-3, eIF-1, eIF-1A ve eIF-5 40S ribozomal alt birime bağlanır. Başlatıcı metionil tRNA eIF-2 tarafından (GTP ile kompleks halinde) ve mRNA eIF-4E (5' kepe bağlanır), eIF-4G (5' kepe bağlı eIF-4E'ye ve 3'poliA kuyruğundaki PABP'ye bağlanır), eIF-4A ve eIF-4B tarafından ribozoma getirilir. Daha sonra ribozom AUG başlama kodonunu bulmak üzere mRNA'yı tarar. Bu tarama işlemi enerji gerektirir ve ATP hidrolizi ile birlikte yürür. Başlatıcı AUG tanımlandığı zaman eIF-2'ye bağlı olan GTP'nin hidrolizi tetiklenir ve bunu GDP ile kompleks halinde olan eIF-2'nin ve diğer başlama faktörlerinin ayrılması takip eder. Daha sonra 60S ribozomal alt birim 40S kompleksine bağlanır.



ayrılmasını uyaran konformasyonal değişikliği tetikler. Ribozomlarla ilgili son çalışmaların dikkate değer bir sonucu da, peptidil transferaz aktivitesi gibi, deşifre merkezinde doğru kodon-antikodon eşleşmesinin algılanmasının proteinlerin değil, esas olarak ribozomal RNA'nın aktivitesine dayanıyor olmasıdır.

EF-Tu (veya eEF-1α) ribozomu terk eder etmez P bölgesindeki başlatıcı metionil tRNA ve A bölgesindeki ikinci aminoaçil tRNA arasında peptid bağı oluşabilmektedir. Bu reaksiyon ribozomal RNA'nın kritik rolüyle (daha önce tartışıldığı gibi), büyük ribozomal alt birim tarafından katalizlenir. Sonuç, metioninin ribozomun A bölgesindeki aminoaçil tRNA'ya transferi ile bu pozisyonda peptidil tRNA oluşması ve P bölgesindeki başlatıcı tRNA'nın yüksüz kalmasıdır. Uzamadaki ikinci adım, diğer bir uzama faktörünü gerektiren (prokaryotta EF-G, ökaryotta eEF-2) ve yeni bir GTP hidrolizi ile birlikte ilerleyen translokasyondur. Translokasyon sırasında ribozom, bir sonraki kodon boş A bölgesine gelecek şekilde, mRNA üzerinde üç nükleotid kayar. Bu aşama peptidil tRNA'yı A bölgesinden P bölgesine, yüksüz tRNA'yı da P bölgesinden E bölgesine aktarır. Böylece ribozom, A bölgesi boş ve P bölgesinde

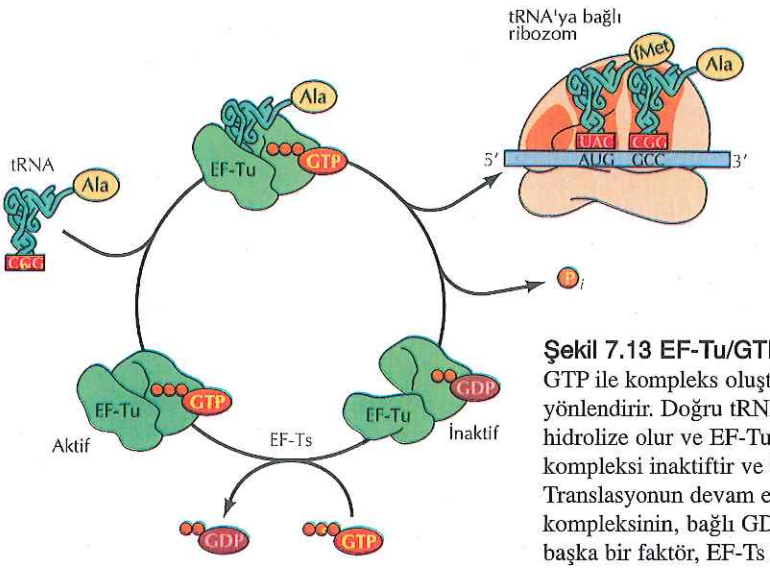
Şekil 7.12 Çeviri uzama aşaması
Ribozom P (peptid), A (aminoaçil) ve E (çıkış) ile gösterilen üç bağlanma bölgesi içerir. Başlatıcı N-formilmetionil tRNA A bölgesini boş bırakacak şekilde P bölgesine yerleşir. İkinci aminoaçil tRNA (örn., alanil tRNA) EF-Tu (GTP ile kompleks halinde) tarafından A bölgesine getirilir. GTP hidrolizini takiben EF-Tu (GDP ile kompleks halinde) ribozomu terk eder, alanil tRNA A bölgesine yerleşmiştir. Daha sonra, peptid bağı kurularak metioninin, A bölgesindeki aminoaçil tRNA'ya aktarılır. Bundan sonra ribozom mRNA üzerinde üç nükleotid kayar. Bu hareket, peptidil (Met–Ala) tRNA'yı P bölgesine, yüksüz tRNA'yı da E bölgesine yerleştirir, böylece bir sonraki amino asidin eklenmesi için A bölgesi boşalır. Translokasyon GTP hidrolizi ile birlikte iş gören EF-G tarafından sağlanır. Burada prokaryot hücreler için gösterilen süreç ökaryotlarda da benzer şekilde gerçekleşir. (Tablo 7.1'de ökaryot uzama faktörlerinin adları verilmiştir).



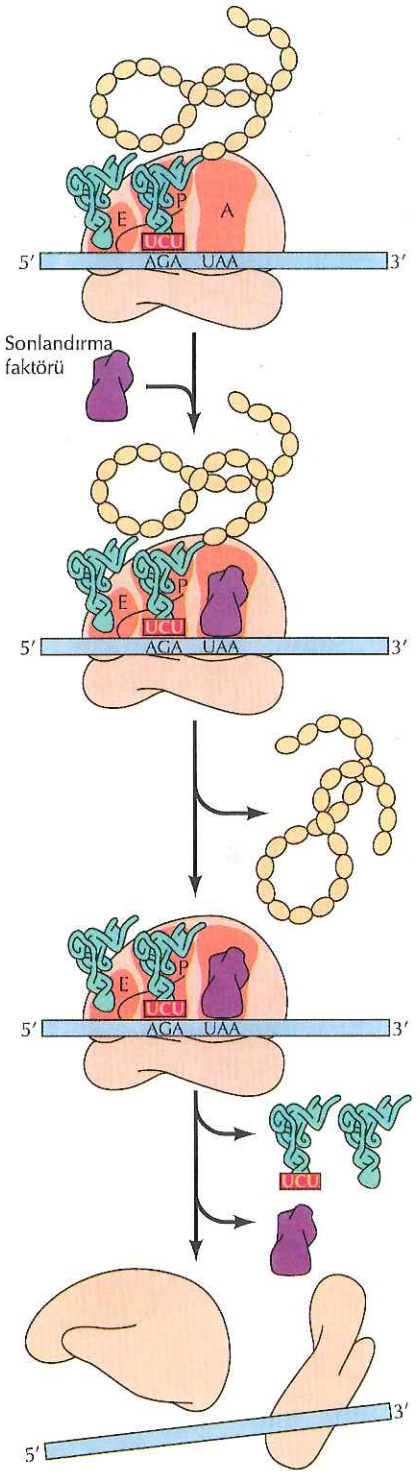
peptidil tRNA bağlı olarak kalır. A bölgesine yeni bir aminoaçil tRNA'nın bağlanması E bölgesindeki yüksüz tRNA'nın ayrılmasını uyarır, böylece ribozom, büyüyen polipeptid zincirine bir sonraki amino asitin katılımı için hazır hale gelir.

Uzama devam ederken ribozomdan ayrılan GDP bağlı EF-Tu (veya eEF-1α) GTP formuna geri dönmelidir (Şekil 7.13). Bu dönüşüm için EF-Tu/GDP kompleksine bağlanarak bağlı GDP'nin GTP ile değişimini hızlandıran üçüncü bir uzama faktörü EF-Ts (ökaryotta eEF-1βγ) gereklidir. Bu değişim EF-Tu/GTP'nin yenilenmesiyle sonlanır ve yeni bir uzama döngüsünü başlatmak üzere bir aminoaçil tRNA'yı ribozomun A bölgesine götürür. GTP bağlanması ve hidrolizi ile EF-Tu'nun regülasyonu protein aktivitelerinin genel anlamdaki regülasyonudur. Daha ilerideki bölümlerde de tartışılacağı gibi, benzer mekanizmalar protein transportu ve salınımının yanı sıra, hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolunda rol oynayan birçok proteinin aktivitesini de kontrol eder.

Polipeptid zincirinin uzaması, dur kodonu (UAA, UAG veya UGA) ribozomun A bölgesine gelinceye kadar devam eder. Hücrelerde bu sonlanma sinyallerine karşı gelen antikodona sahip tRNA'lar bulunmaz, bunun yerine sinyalleri tanıyan **sonlandırma faktörleri** bulunur ve protein sentezini sonlandırırlar (Şekil 7.14). Prokaryot



Şekil 7.13 EF-Tu/GTP rejenerasyonu
GTP ile kompleks oluşturan EF-Tu aminoaçil tRNA'yı ribozoma yönlendirir. Doğru tRNA'nın ilavesi ile birlikte bağlı bulunan GTP hidrolize olur ve EF-Tu GDP ile birlikte serbest kalır. EF-Tu/GDP kompleksi inaktiftir ve başka bir tRNA'yı bağlayamaz. Translasyonun devam edebilmesi için, aktif EF-Tu/GTP kompleksinin, bağlı GDP'nin serbest GTP ile değişimini sağlayan başka bir faktör, EF-Ts tarafından yenilenmesi gereklidir.



Şekil 7.14 Çevirinin sonlanması
A bölgesindeki dur kodonu (örn., UAA) tRNA yerine sonlandırma faktörü tarafından tanınır. Sonuçta, tamamlanmış polipeptid ve onun ardından da mRNA ve tRNA ribozomdan ayrılır.

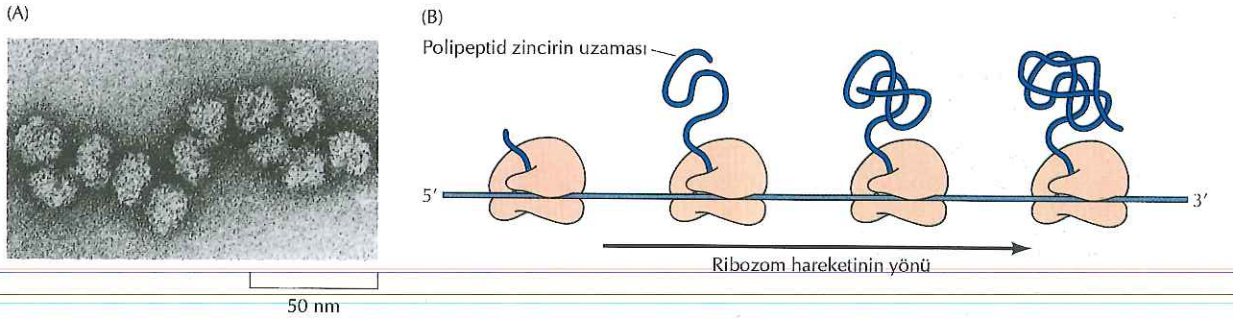
hücrelerde bitiş kodonlarını tanıyan iki **sonlandırma faktörü** bulunur; RF-1 UAA veya UAG'yi tanır RF-2 UAA veya UGA'yı tanır (bkz. Tablo 7.1). Ökaryot hücrelerde üç sonlandırma kodonunun tümünü tek sonlandırma faktörü (eRF-1) tanır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerin her ikisinde de özgül bitiş kodonlarını tanımayan, ancak RF-1 (veya eRF-1) ve RF-2 ile birlikte iş gören sonlandırma faktörleri bulunur (RF3 ve eRF3). Sonlandırma faktörü A bölgesindeki bitiş kodonuna bağlanır ve tamamlanmış polipeptidin ribozomdan salınmasına neden olan P bölgesindeki polipeptid ve tRNA arasındaki bağın hidrolizini tetikler. Daha sonra tRNA serbest kalır ve ribozomal alt birimlerle mRNA kalıbı birbirinden ayrılırlar.

Prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de mRNA'lar, çok sayıda ribozom tarafından, eş zamanlı olarak okunabilir. Bir ribozom başlama bölgesinden uzaklaşır uzaklaşmaz başka biri mRNA'ya bağlanır ve yeni bir polipeptid sentezi başlar. Böylece mRNA genellikle aralarında 100 ila 200 nükleotid aralık bulunan ribozom serileri tarafından proteine çevrilirler (Şekil 7.15). mRNA'ya bağlı ribozom grupları, poliribozom veya **polizom** olarak adlandırılırlar. Grup içinde her ribozom bağımsız olarak, ayrı bir polipeptid zincirini sentezletir.

Çevirinin Düzenlenmesi

Transkripsiyon, her ne kadar gen ekspresyonunu ilk aşamasında kontrol ediyor ise de, hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde mRNA'nın proteine çevrimi de denetlenmektedir. Çevrimin kontrolünde yer alan mekanizmalardan biri, translasyonu durdurmak üzere represör moleküllerin özgül mRNA dizilerine bağlanmasıdır. Bu mekanizmanın en iyi bilinen örneği, hücre içinde demir depolayan bir protein olan ferritinin sentezinin düzenlenmesidir. Ferritin mRNA'sının çevrimi ortamda bulunan demir tarafından, fazla miktarda demir mevcut ise daha fazla ferritin sentezlenerek düzenlenir (Şekil 7.16). Bu düzenleme translasyonu durdurmak üzere, ferritin mRNA'sının proteine çevrilmeyen 5' bölgesindeki bir dizine (demir yanıt elemanı veya IRE) bağlanan bir protein aracılığı ile gerçekleştirilir. Demir varlığında, represör IRE'ye bağlanamaz ve ferritin çevrimi devam eder.

Hatırlanması gereken bir konu da, ferritin mRNA çevriminin demir tarafından regülasyonunun, daha önceki bölümde tartışılan, transferrin reseptör mRNA kararlılığının düzenlenmesine çok benzer olduğudur (bkz. Şekil 6.51). Şöyle ki, transferrin reseptör mRNA'sının stabilitesi, proteine çevrilmeyen 3' bölgesine bağlanan bir protein tarafından düzenlenir. Ferritin ve transferrin reseptör mRNA'larının her ikisinin de IRE'lerine aynı protein bağlanır. Bununla birlikte, proteinin iki IRE'ye bağlanmasının sonuçları oldukça farklıdır. Transferrin reseptöründe IRE'ye protein bağlanması translasyonu inhibe etmek yerine mRNA'yı yıkılmaktan korur. Bu farklı etkiler muhtemelen IRE'nin iki mRNA'da farklı yerleşimde olmasının sonucudur. Represör bağlanma bölgesi olarak iş görmesi için, ferritin

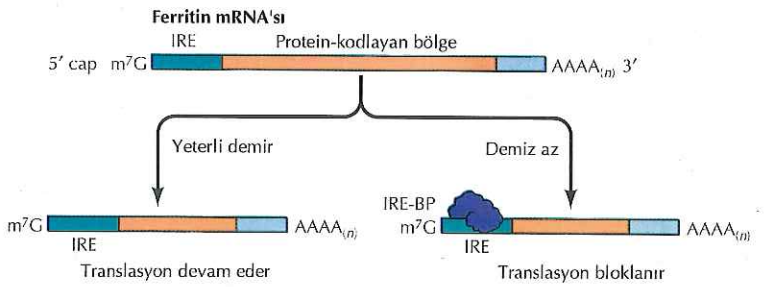


Şekil 7.15 Polizomlar
Mesajcı RNA'lar çok sayıda ribozom tarafından seri halinde (polizom) proteine çevrilirler. (A) Ökaryot polizomların elektron mikroskop fotoğrafı, (B) Genel polizomların şematik görünümü. 3' ucuna yakın ribozomlar üzerinde daha uzun polipeptidler olduğuna dikkat ediniz. (A, M. Boublik et al., 1990 The Ribosome, p. 117 den, Amerika Mikrobiyoloji Derneği'nin izni ile)

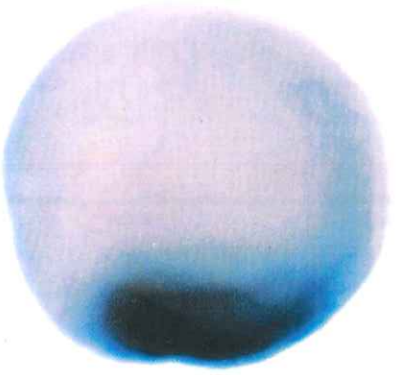
mRNA'sında 5'kepte 70 nükleotidlik bölümde yer alması gerekir ki, proteinin IRE'ye bağlanması 40S ribozomal alt birime bağlanmayı ve kep'i tanımasını engellediği için, translasyon bloke edilebilsin. Transferrin reseptör mRNA'sının 3'-proteine çevrilmeyen bölgesinde aynı dizilere protein bağlanması translasyonu inhibe etmek yerine mRNA'yı nükleaz yıkımından korur. mRNA üzerindeki farklı bölgelere aynı regülatör proteinin bağlanması gen ekspresyonu üzerinde farklı etkiler gösterir; bir durumda translasyonu inhibe ederken diğerinde protein sentezini artıracak olan mRNA stabilizasyonu yaratabilir.

Çevrimsel kontrol özellikle erken gelişim sürecinde önemlidir. Bölüm 6'da tartışıldığı gibi, çeşitli mRNA'lar oositlerde proteine çevrilmeyen formda depolanırlar, bu depolanmış mRNA'ların translasyonu, döllenme aşamasında veya gelişimin daha ileri evrelerinde uyarılır. Bu translasyonel regülasyon mekanizmalarından biri oosit mRNA'larının kontrollu poliadenilasyonudur. Proteine çevrilmeye mRNA'ların çoğu oositlerde kısa poli A kuyrukları ile (yaklaşık 20 nükleotid) depolanırlar. Bu depolanmış mRNA'lar daha sonra gelişimin uygun evrelerinde poli A kuyruklarını birkaç yüz nükleotide uzatarak translasyon için tekrar devreye girerler. Ayrıca, gelişim sürecinde bazı mRNA'ların translasyonu, proteine çevrilmeyen 3' bölgesindeki özgül dizilere bağlanan represör proteinler tarafından düzenlenirler.

Mesajcı RNA'nın 3' ucundaki proteine çevrilmeyen bölgesine bağlanan proteinler aynı zamanda, proteinlerin özgül hücre içi konumlarda üretimini sağlamak üzere, mRNA'nın özgül hücre bölgelerine yerleşiminden de sorumludur. Hareketli fibroblastlar, sinir hücreleri, embriyolar ve yumurta hücreleri de dahil olmak üzere, çeşitli hücre tiplerinde mRNA'nın yerleşimi translasyonun düzenlenmesinde önemli bir aşamadır. Örneğin, yumurta ve embriyoda mRNA'nın özgül bir bölgeye yerleşmesi, kodlanan proteinlerin gelişen embriyoda uygun yerde sentezlenmesine olanak



Şekil 7.16 Ferritinin çevrimsel regülasyonu
Mesajcı RNA 5' kep bölgesine yakın bölgede demir yanıt elemanı (IRE) içerir. Ortamda yeterli miktarda demir bulunması halinde mRNA'nın translasyonu normal olarak devam eder. Eğer demir eksikliği varsa, bir protein (demir yanıt elemanına bağlanan protein veya IRE–BP olarak adlandırılır) IRE'ye bağlanır ve mRNA'nın okunmasını engeller.



Şekil 7.17 *Xenopus* oositlerinde mRNA'nın yerleşimi
Xenopus oositlerinin bitkisel korteksinde Xlerk mRNA'sının yerleşiminin *in situ* hibridizasyon ile gösterilmesi.

sağlama açısından, gelişimde önemli rol oynar (Şekil 7.17). mRNA'ların yerleşimi ve translasyonlarının düzenlenmesi birbirine bağlıdır, yani, kodlanan proteinler uygun gelişim evresinde ve mRNA doğru hedeflendiği zaman sentezlenir.

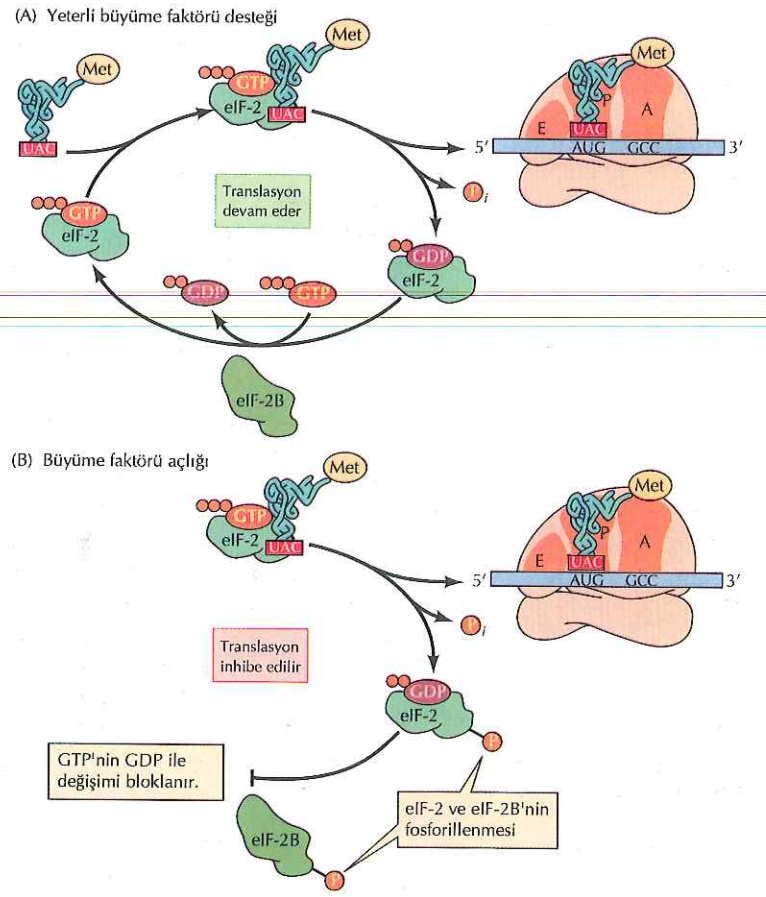
Son zamanlardaki çalışmalar, mRNA'ların proteine çevriminin sadece proteinler tarafından değil aynı zamanda mRNA dizilerine homolog, kodlamayan RNA'lar ile de düzenlenebildiğini gösterdi. Bu kodlamayan regülatör RNA'ların büyük bir kısmı, küçük çift iplikli moleküllerdir ve RNA interferans mekanizması ile hedef mRNA'nın yıkımını tetikler (bkz. Şekil 3.41). Bu kodlamayan RNA'ların rolü özellikle bitkilerde iyi anlaşılmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da yaklaşık 50 genin translasyonunun bu mekanizma ile düzenlendiği belirlenmiştir.

Ökaryot hücrelerde diğer bir translasyon denetim mekanizması, özgül mRNA'ların çevrimini değil, daha geniş translasyon aktiviteleri üzerinde etki yaratan başlama faktörlerinin, özellikle eIF-2 ve eIF-4E'nin aktivitelerinin değiştirilmesini kapsar. Daha önce de tartışıldığı gibi, eIF-2 (GTP ile kompleks halinde) başlatıcı metionil tRNA'ya bağlanarak onu ribozoma getirir. Daha sonra eIF-2'nin serbest kalmasına GTP hidrolizi eşlik eder ve eIF-2, inaktif GDP kompleksi olarak kalır. Yeni bir başlama döngüsüne katılabilmesi için, bağlı GDP nin GTP'ye değişimi ile eIF-2 / GTP kompleksinin yenilenmesi gerekir (Şekil 7.18). Bu değişim diğer bir faktör olan eIF-2B aracılığı ile gerçekleşir. Böylece eIF-2B aktivitesinin GTP bağlanması ve hidrolizi ile kontrol edilmesi EF-Tu'dakine benzerdir (bkz. Şekil 7.13). Bununla birlikte, eIF-2'nin düzenlenmesi çeşitli ökaryot hücrelerde kritik bir kontrol noktası sağlar. Özellikle eIF-2 ve eIF-2B'nin her ikisi de düzenleyici protein kinazlarla fosforile edilebilir. Bu fosforilasyon, GTP oluşumu için GDP değişimini, dolayısı ile translasyonun başlamasını inhibe eder. Örneğin, eğer bir memeli hücresi büyüme faktörsüz bekletilirse, eIF-2B'yi fosfatlayan bir protein kinaz aktive olur ve protein sentezini inhibe eder.

Mesajcı RNA'ların 5' kep bölgesine bağlanan eIF-4E'nin aktivitesinin düzenlenmesi, protein sentezinin kontrolunda etkin olan diğer bir kritik noktadır. Örneğin, memeli hücrelerinde protein sentezini uyaran büyüme faktörleri, eIF-4E'ye bağlanan regülatör proteinleri (eIF-4E'ye bağlanan proteinler veya 4E-BP'ler olarak adlandırılırlar) fosfatlayan protein kinazları aktive eder. Uygun büyüme faktörlerinin yokluğunda fosfatlanmamış 4E-BP'ler eIF-4E'ye bağlanır ve eIF-4E ile eIF-4G'nin etkileşimini engelleyerek translasyonu inhibe eder (bkz. Şekil 7.11). Yeterli miktarda büyüme faktörü mevcut olduğu zaman, 4E-BP'lerin fosforilasyonu eIF-4E ile etkileşimlerini önler ve hızlı bir şekilde translasyonun başlamasına yol açar.

Protein Katlanması ve İşlenmesi

Proteine çevrim ile hücrede genetik bilgi akışı tamamlanır. Böylece, DNA'daki nükleotid dizisi polipeptid zincirinde amino asit dizisine çevrilmiştir. Ancak, polipeptidin sentezi fonksiyonel proteinin üretimine eşdeğer değildir. Kullanılır hale gelmesi için polipeptidin son üç boyutlu konformasyonuna katlanması ve birçok durumda da, fonksiyonel kompleksi oluşturmak üzere polipeptid zincirlerinin bir araya gelmeleri gerekir. Ek olarak birçok protein hücre içinde doğru yerleşim ve fonksiyonları için kritik olan kesim, karbohidratların ve lipidlerin kovalent bağlanması da dahil olmak üzere daha ileri değişimlere gitmektedir.



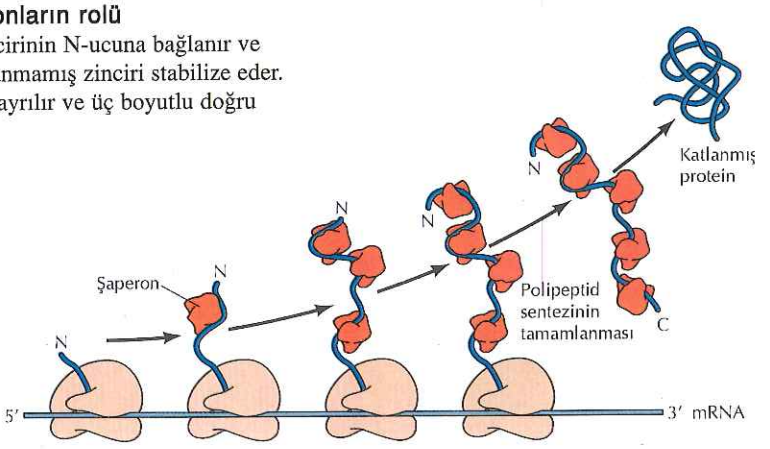
Şekil 7.18 eIF-2 ve eIF-2B' nin fosforilasyonu ile translasyonun düzenlenmesi
eIF-2 nin aktif formu (GTP ile birleşmiş) başlatıcı metionil tRNA'yı ribozoma götürür (bkz. Şekil 7.11). Daha sonra eIF-2 GDP bağlı inaktif formda ribozomdan ayrılır. Translasyonun devamı için, eIF-2 nin eIF-2B tarafından bağlı GDP'nin GTP ile değişimi sağlanarak tekrar aktive edilmesi gerekir. Regülatör protein kinazlar tarafından eIF-2 veya eIF-2B den herhangi birinin fosfatlanması ile (örneğin hücrelerde büyüme faktörü açlığı varsa) translasyon inhibe edilebilir. Bu fosforilasyonlar GTP'nin GDP ile değişimini engeller böylece eIF-2/GTP yenilenemez.

Şaperonlar ve Protein Katlanması

Bölüm 2'de gözden geçirildiği gibi proteinlerin üç boyutlu konformasyonları onları oluşturan amino asitlerin yan grupları arasındaki etkileşimin sonucudur. Protein katlanmasının klasik prensibi, bir proteinin doğru üç boyutlu yapıya ulaşması için gerekli tüm bilginin amino asit dizisi tarafından sağlandığıdır. Bu fikir, Christian Anfinsen'in *in vitro* ortamda denatüre RNaz'ın kendiliğinden aktif konformasyonunu aldığını gösterdiği deneyleri ile başlayıp yerleşmiştir (bkz. Şekil 2.17). Protein katlanması ek hücresel faktörlerin gerekmediği, kendi kendine toparlanma gibi görülmekte idi. Bununla birlikte daha yeni çalışmalar kendiliğinden bir araya gelmenin hücre içindeki protein katlanması için yeterli bir tanım olmadığını göstermiştir. Proteinlerin hücre içindeki doğru katlanması başka proteinlerin aktiviteleri aracılığı ile sağlanmaktadır.

Diğer proteinlerin katlanmasını kolaylaştıran proteinler moleküler **şaperonlar** olarak adlandırılırlar. Bu terim ilk kez Ron Laskey tarafından, DNA ve histonların nükleozomu oluşturması için gerekli olan bir protein (nükleoplazmin) için kullanmıştır. Nükleoplazminler histonlara bağlanır ve nükleozom oluşumuna aracılık eder, ancak kendisi nükleozomun son yapısına katılmaz. O halde şaperonlar, oluşan kompleksin bir parçası olmadan katalist gibi davranırlar ve bir araya gelmeyi kolaylaştırırlar. Daha sonraki çalışmalar birleşme sürecine, özellikle protein katlanmasına aracılık eden proteinler kavramını yaygınlaştırmıştır.

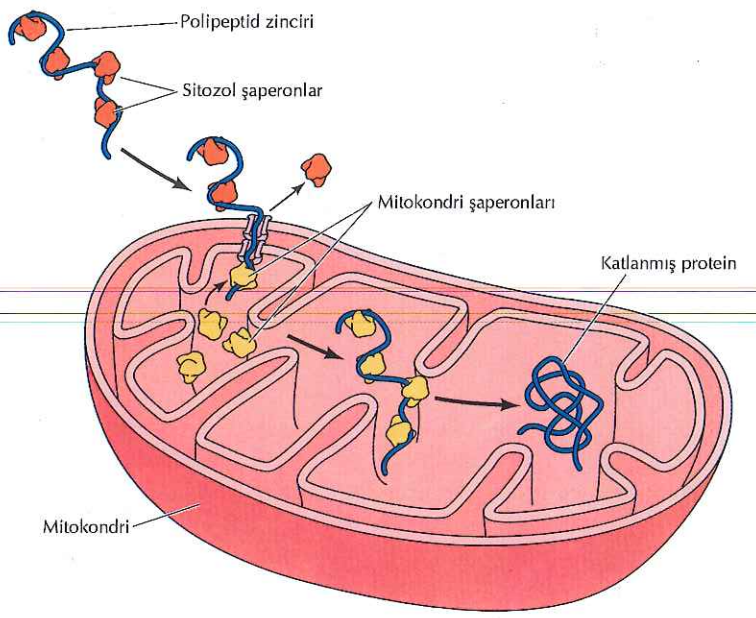
Şekil 7.19 Translasyon sırasında şaperonların rolü
Şaperonlar sentezlenmekte olan polipeptid zincirinin N-ucuna bağlanır ve polipeptid sentezi tamamlanıncaya kadar, katlanmamış zinciri stabilize eder. Tamamlanmış protein daha sonra ribozomdan ayrılır ve üç boyutlu doğru konformasyonuna katlanabilir.



Şaperonların, polipeptidlerin doğru üç boyutlu yapıya katlanması için gerekli olan ek bilgileri taşımadığını ve proteinlerin katlanmış konformasyonlarının sadece onun amino asit dizini tarafından tanımlandığını belirtmek gerekir. Şaperonlar daha çok kendiliğinden bir araya gelme sürecinde yardımcı olarak protein katlanmasını katalizlerler. Şaperonlar, en son doğru katlanmaya giden yolda ara ürün olan katlanmamış veya kısmen katlanmış polipeptidlere bağlanarak ve kararlılıklarını sağlayarak işlev görürler. Şaperonların yokluğunda, katlanmamış veya kısmen katlanmış polipeptid zincirleri, genellikle hatalı katlanarak veya çözünmeyen birikimler oluşturarak kararsız hal alır ve yıkılırlar. Katlanmamış polipeptidlere şaperonlar bağlanarak onları stabilize eder, böylece, hatalı katlanmayı veya kümelenmeyi engelleyerek polipeptidlerin doğru konformasyona katlanmasına olanak sağlarlar.

Şaperonların, ribozom üzerinde sentezlenmekte olan yeni polipeptid zincirine bağlanarak hatalı katlanmayı ya da sentez bitmeden polipeptidin amino ucunun kıvrılmasını önlemesi güzel bir örnek oluşturur (Şekil 7.19). Proteinler, sentezlenmekte olan zincirin tüm bölgelerinin tamamlanması ve proteinin doğru konformasyona katlanabilmesi ve yeni oluşan zincirin hatalı katlanmasını veya diğer proteinlerle kümeleşmesini önlemek üzere, 50 ila 300 amino asitlik bölümler halinde katlanırlar. Şaperon bağlanması, katlanmamış konformasyondaki amino terminalini polipeptidin geri kalan kısmı sentezlenip proteinin doğru katlanması tamamlanıncaya kadar stabilize eder. Şaperonlar aynı zamanda katlanmamış polipeptid zincirlerinin organellere taşınması sırasında da - örneğin proteinlerin sitozolden mitokondriye taşınmasında olduğu gibi, kararlı halde tutarlar (Şekil 7.20). Proteinler mitokondri zarlarından, sitozolde şaperonlar tarafından korunmuş ve tümüyle katlanmamış bir şekilde geçerler. Şaperonlar mitokondri içinde de, polipeptid zincirinin zardan geçip organel içerisinde katlanmasını kolaylaştırırlar. Ayrıca, çoklu polipeptid zincirinden oluşan proteinlerin ve makromoleküler yapıların bir araya gelmesine de katılırlar (nükleoplazmin gibi).

Bugün moleküler şaperon olarak iş gördüğü bilinen proteinlerin çoğu (Tablo 7.2) başlangıçta **ısı-şok proteinleri** (heat-shock proteins) olarak tanımlanan, çevresel stres ve yüksek sıcaklıkta eksprese edilen bir protein grubudur. Prokaryot ve ökaryot hücrelerde iyi korunmuş olan ısı-şok proteinleri (Hsp olarak kısaltılır) yüksek sıcaklıkla



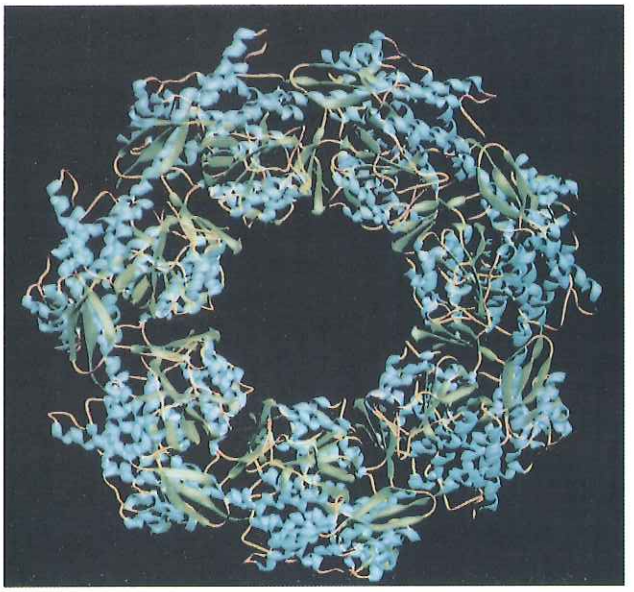
Şekil 7.20 Protein transportu sırasında şaperonların rolü
Kısmen katlanmış polipeptid, sitozolden mitokondriye aktarılır. Sitozol şaperonları katlanmamış yapının korunmasını sağlarlar. Mitokondri şaperonları aktarımı ve daha sonra polipeptid zincirinin organel içinde katlanmasını kolaylaştırırlar.

karşılaşma sonucunda kısmen denatüre olan proteinleri korur ve tekrar katlanmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, ısı-şok protein ailesinin birçok üyesi, normal çoğalma koşullarında da eksprese edilirler ve temel hücresel işlevleri vardır. Moleküler şaperon olarak hizmet eden bu proteinler çevresel stresle karşılaşan hücrelerde olduğu kadar normal şartlar altında da polipeptidlerin katlanması ve transportu için gereklidir.

Isı-şok protein ailelerinden Hsp70 ve Hsp60, ökaryot ve prokaryot hücrelerin genel protein katlanma yolaklarında özellikle önemlidir. Her iki ailenin proteinleri polipeptid zincirlerinin katlanmamış bölgelerine bağlanarak iş görür. Hsp70 ailesinin üyeleri polipeptidlerin, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi çeşitli hücresel kompartmanlara taşınmasında olduğu kadar, çevrim sırasında yeni sentezlenen, katlanmamış polipeptid zincirlerini stabilize ederek de görev yapar (örnek için bkz. Şekil 7.19). Bu proteinler, katlanmamış polipeptidlerin kısa hidrofobik bölgelerine (yaklaşık yedi amino asitlik) bağlanarak, onları bu katlanmamış konfigürasyonda tutar ve birikmelerini önlerler.

TABLO 7.2 Moleküler Şaperonlar

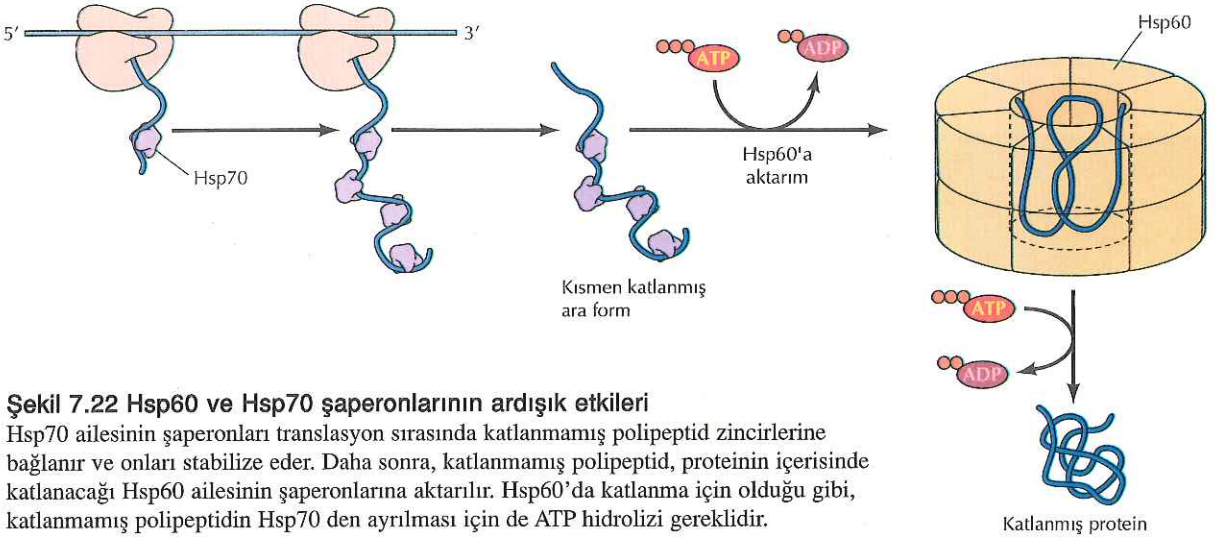
	Şaperon proteinleri	
Protein ailesi	**Prokaryotlar**	**Ökaryotlar**
Hsp70	DnaK BiP (endoplazmik retikulum) SSCI (mitokondri) ctHsp70 (kloroplast)	Hsc73(sitozol)
Hsp60	GroEL Hsp60 (mitokondri)	TriC (sitozol) Cpn60 (kloroplast)
Hsp90	HtpC Grp94 (endoplazmik retikulum)	Hsp90 (sitozol)



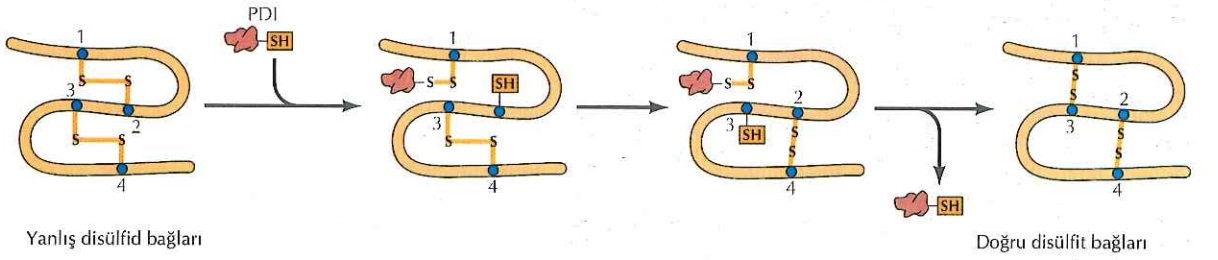
Şekil 7.21 Bir şaperoninin yapısı
Hsp60 ailesinin üyesi olan GroEL, birbirinin üzerine oturan iki halkadan oluşmuş, ortası delik bir silindirdir. Her halka yedi alt birimden oluşur. (Yale Üniversitesi'nden Paul B. Sigler'in izni ile kullanılmıştır)

Hsp60 ailesinin üyeleri (aynı zamanda **şaperoninler** olarak da adlandırılırlar) proteinlerin, kendilerine özgü konformasyonlarına katlanmalarını da kolaylaştırır. Her şaperonin, birbirinin üzerine oturarak, iki halkalı bir silindirik yapı oluşturan, her biri yaklaşık 60 kilodaltonluk (kd) 14 alt birimden oluşur (Şekil 7.21). Katlanmamış polipeptid zincirleri şaperonin silindirlerinin merkezindeki boşluğa bağlanarak sitozolden korunurlar. Polipeptid zincirlerinin katlanmamış bölgelerinin kümelenmesi, şaperoninlere bağlanarak engellenir ve bu izole ortamda protein katlanması devam edebilir. Katlanmamış polipeptid zincirlerinin şaperonine bağlanması, enerji kaynağı olarak ATP hidrolizi ile birlikte giden tersinir bir reaksiyondur. Böylece ATP hidrolizi polipeptidin katlanmamış kısımlarının tekrar tekrar şaperonine bağlanıp serbest kalması ile polipeptidin yavaş yavaş doğru konformasyona katlanmasına olanak sağlar.

Bazen, Hsp70 ve Hsp60 ailelerinin üyeleri ardışık şekilde birlikte çalışırlar. Örneğin, Hsp70 ve Hsp60 ailelerinin üyeleri proteinlerin mitokondriye taşınması ve *E. coli*'de yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması sırasında bu şekilde çalışırlar (Şekil 7.22). İlk olarak bir Hsp70 şaperonu, sentezlenmekte olan polipeptid zincirini protein sentezi tamamlanıncaya kadar stabilize eder. Daha sonra katlanmamış protein zinciri, içerisinde, fonksiyonel üç boyutlu konformasyona doğru biçimde katlanacağı Hsp60 şaperoninine transfer olur. Hsp70 ve Hsp60 ailelerinin üyeleri sadece bakteride değil ökaryot hücrelerde de sitozolde ve hücre içi organellerde (mitokondri gibi) bulunur (bkz. Tablo 7.2), Hsp70 ve Hsp60'ın bu şekilde, birbiri ardından iş görmesi, bunun genel protein katlanma yolu olduğunu gösterir. Sitozol ve endoplazmik retikulumdaki bazı proteinlerin katlanması için alternatif bir yolda da Hsp70 ve Hsp90 aile



Şekil 7.22 Hsp60 ve Hsp70 şaperonlarının ardışık etkileri
Hsp70 ailesinin şaperonları translasyon sırasında katlanmamış polipeptid zincirlerine bağlanır ve onları stabilize eder. Daha sonra, katlanmamış polipeptid, proteinin içerisinde katlanacağı Hsp60 ailesinin şaperonlarına aktarılır. Hsp60'da katlanma için olduğu gibi, katlanmamış polipeptidin Hsp70 den ayrılması için de ATP hidrolizi gereklidir.



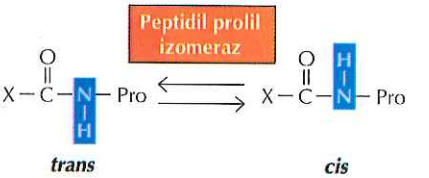
Şekil 7.23 Protein disülfit izomeraz'ın rolü
Protein disülfit izomeraz (PDI), polipeptid zinciri içinde disülfit çiftleri arasında değiş tokuşu sağlamak üzere, disülfit bağlarının yıkılıp tekrar kurulmasını katalizler. Enzim, polipeptiddeki sisteinler arasında disülfit bağı oluşturur ve daha sonra bu disülfit bağlarını başka sisteinlerle değiştirir. Bu örnekte, PDI yanlış disülfit bağlarının (1-2 ve 3-4) doğru çiftlere (1-3 ve 2-4) dönüşmesini katalizler.

üyelerinin ardışık etkileri görülmektedir. Hsp90 tarafından katlanan sübstratların büyük bir kısmı, steroid hormonlar için reseptörleri ve çeşitli protein kinazları da içeren, hücre sinyal iletimine katılan proteinlerdir.

Enzimler ve Protein Katlanması

Kısmen katlanmış ara ürünlere bağlanıp stabilize ederek protein katlanmasını kolaylaştıran şaperonlara ilave olarak hücreler, protein katlanmasını katalizleyen en az iki tip enzim bulundururlar. Birçok proteinin katlanmış yapısının kararlı hale gelmesinde, sistein amino asitleri arasındaki disülfit bağı oluşumu önemlidir (bkz. Şekil 2.16). Christian Anfinsen tarafından 1963 yılında keşfedilen **protein disülfit izomeraz,** bu bağların yıkımını ve tekrar oluşumunu katalizler (Şekil 7.23). Çok sayıda sistein içeren proteinler için, protein disülfit izomeraz (PDI) disülfit çiftleri arasında hızlı değişimi artırarak önemli rol oynar, böylece proteinin en kararlı konformasyonu ile uyumlu disülfit düzenine erişmesine imkan verir. Disülfit bağları genellikle salgılanan proteinler ve zar proteinleri ile sınırlıdır, çünkü sitozol sisteinleri indirgenmiş formunda (-SH) tutacak redükleyici ajanlar içerir ve böylece disülfit (S–S) bağı oluşumu engellenir. Ökaryot hücrelerde disülfit bağları, içinde oksitileyici ortamın bulunduğu endoplazmik retikulumda oluşur. Salgılanacak proteinlerin stabilize edilmesinde disülfit bağlarının rolü ile uyumlu olarak endoplazmik retikulumdaki PDI aktivitesi farklı hücrelerde salgı proteinlerinin düzeyi ile ilişkilidir.

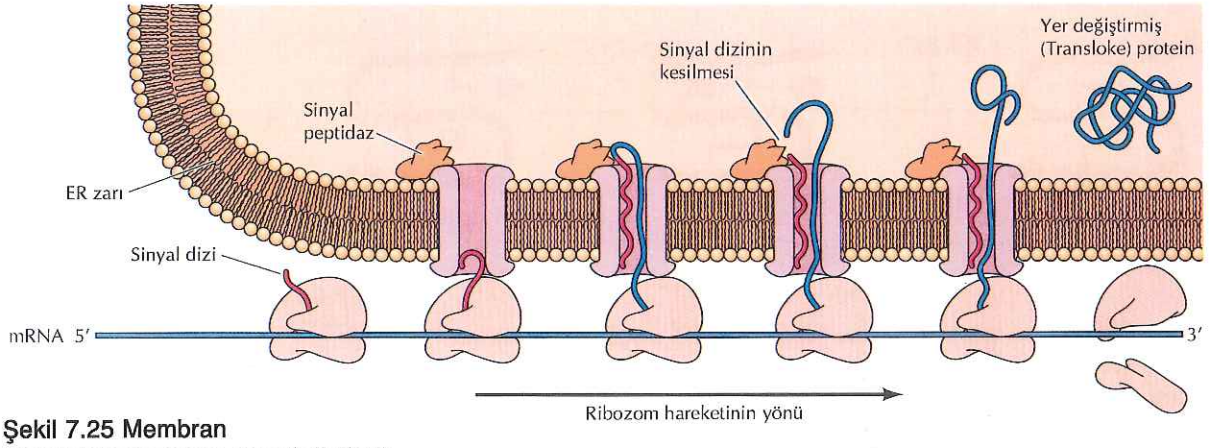
Protein katlanmasında rol oynayan ikinci enzim prolinlerin katıldığı peptid bağlarının izomerizasyonunu katalizler (Şekil 7.24). Prolin, peptid bağlarının *sis* ve *trans* konformasyonunu eşit dağılımdan biraz daha trans forma geçmesini tercih ettiren sıra dışı bir amino asittir. Buna karşılık diğer amino asitler arasındaki peptid bağları hemen her zaman *trans* formdadır. Proteinlerin katlanmasında hız sınırlayıcı aşama olma özelliği taşıyan prolil-peptid bağlarının *sis* ve *trans* konfigürasyonları arasındaki izomer dönüşümü **peptidil prolil izomeraz** enzimi tarafından katalizlenir. Bu enzim prokaryot ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunur ve bazı proteinlerin katlanmasında önemli rol oynar.



Şekil 7.24 Peptidil prolil izomeraz'ın görevi
Peptidil prolil izomeraz, prolin içeren peptid bağlarının *cis* ve *trans* konformasyonlar arası izomerizasyonu katalizler.

Protein Kesimi

Birçok proteinin olgunlaşmasında polipeptid zincirinin kesilmesi (**proteoliz**) önemli bir aşamadır. En basit örnek, ribozomda oluşmaya başlayan polipeptidin amino terminalindeki başlatıcı metiyoninin polipeptidden uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra, amino ucuna genellikle asetil grubu veya yağ asidi zinciri gibi (yakında söz edilecek) kimyasal grupların eklenmesi gerçekleşir.

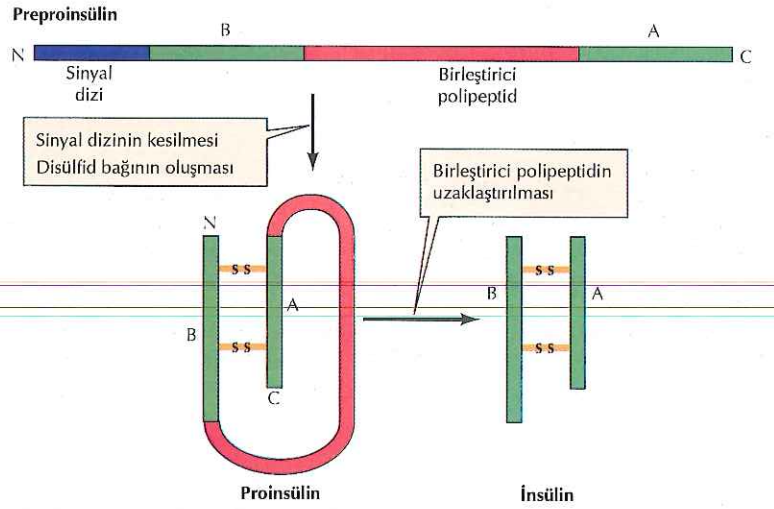


Şekil 7.25 Membran translokasyonunda sinyal dizilerin rolü
Sinyal diziler, polipeptid zincirinin, bakteride plazma zarından veya ökaryot hücrelerde endoplazmik retikulum zarından geçişini (burada görülüyor) hedefler. Polipeptid zincirinin amino ucunda yer alan, hidrofobik amino asitler içeren sinyal dizi, ribozomda belirir belirmez zar kanalına girer. Daha sonra polipeptidin geri kalan kısmı da kanala girer ve sinyal peptidazın etkisi ile sinyal dizi kesilerek, olgun protein serbest kalır.

Amino ucunun proteolitik modifikasyonu, bakterilerde ve ökaryotlarda salgı proteinleri ile, ökaryotlarda plazma zarına, lizozoma, mitokondriye ve kloroplastlara katılacak proteinlerde olduğu gibi, zarı geçecek birçok proteinin translokasyonunda önemli rol oynar. Bu proteinler, gidecekleri yere, amino ucu **sinyal dizileri** sayesinde iletildikten sonra, amino terminal dizileri proteolitik kesimle uzaklaştırılır. Örneğin, yaklaşık 20 amino asit uzunluktaki bu amino terminal sinyal dizileri, daha translasyon devam ederken, salgılanacak proteinleri ökaryotlarda endoplazmik retikuluma veya bakteride plazma zarına hedefler (Şekil 7.25). Çoğunlukla hidrofilik amino asitlerden oluşan sinyal dizileri, ribozomda sentez aşamasında membran kanallarına girer. Polipeptid zincirinin kalan kısmı ise, sentez ilerledikçe membran kanalından geçer. Daha sonra sinyal dizi, özgül bir membran proteazı tarafından (**sinyal peptidaz**) kesilir ve olgun protein serbest kalır. Ökaryot hücrelerde sentezlenen polipeptid zincirinin endoplazmik retikuluma aktarılması, salgılanma, plazma zarına ya da lizozoma katılma için, protein hedeflenmesinde ilk aşamadır. Proteinlerin gideceği yere transportunu yönlendiren mekanizmalar ve proteinlerin mitokondri ve kloroplasta alınmasını hedefleyen dizilerin rolü Bölüm 9 ve 10'da detaylı olarak tartışılacaktır.

Proteolitik işlenmeye diğer bir önemli örnek de, aktif enzim veya hormonların büyük öncüllerden kesimle oluşmalarıdır. Büyük bir polipeptid olarak sentezlenen insulin iki kesim sonrasında oluşur. Başlangıç öncülü (preproinsulin) polipeptidi endoplazmik retikuluma hedefleyen bir amino ucu sinyal dizisi taşır (Şekil 7.26). Endoplazmik retikuluma transfer sırasında sinyal dizilerin uzaklaştırılması proinsulin adı verilen ikinci öncülü verir. Bu öncül daha sonra, aradaki bir peptid grubunun proteolitik uzaklaştırılması ile insuline (disülfit bağı ile bir arada tutulan iki zincirden oluşur) çevrilir. Kanın pıhtılaşması ve sindirim enzimleri gibi diğer proteinler de benzer kesim süreçleri ile aktive olurlar.

Birçok hayvan virusunun proteinlerinin de büyük öncüllerden kesimle türetilmeleri ilginçtir. Proteoliz işleminin virus replikasyonunda özellikle önemli olduğunu gösteren bir örnek HIV'den gelmektedir. HIV'in replikasyonunda virus tarafından kodlanan bir proteaz viral yapısal proteinleri oluşturmak üzere öncül polipeptidi keser. Virus replikasyonundaki temel rolü nedeni ile HIV



Şekil 7.26 İnsülinin proteolitik işlenmesi
Olgun insülin, disülfit bağları ile bağlanmış iki polipeptid zincirinden (A ve B) oluşur. Amino ucunda, sentezlenmekte olan polipeptidin endoplazmik retikuluma transferi sırasında kesilip çıkarılan bir sinyal dizi içeren öncül polipeptid (preproinsülin) olarak sentezlenir. Bu kesim daha sonra, aradaki birleştirici polipeptidin yıkılarak uzaklaştırılması sonucu insüline dönüşek olan, ikinci bir öncülü (proinsülin) verir.

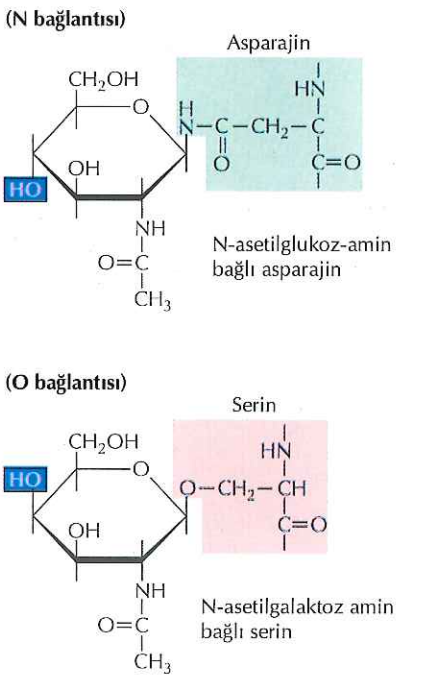
proteaz (revers transkriptaza ek olarak), AIDS tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirilmesinde önemli bir hedeftir. Gerçekte de bu proteaz inhibitörleri bu hastalıkla savaşta elimizde olan ajanlar içinde en etkin olanlardan biridir.

Glikozillenme

Bir çok protein, özellikle ökaryot hücrelerde, **glikozillenme** adı verilen süreçte, karbohidrat eklenerek değiştirilir. Bir çok nükleer ve sitoplazmik protein de glikozillenmekle birlikte, karbohidrat zincirinin eklendiği proteinler (**glikoprotein** olarak adlandırılırlar) genellikle salgılanır veya hücre yüzeyinde yer alırlar. Glikoproteinlerin karbohidrat kısımları endoplazmik retikulumda protein katlanmasında, proteinlerin uygun hücresel bölgelere hedeflenmesinde ve hücre-hücre etkileşim bölgelerinin tanınmasında önemli rol oynar.

Glikoproteinler karbohidrat yan gruplarının takılma bölgesine bağlı olarak N-bağlı veya O-bağlı olarak sınıflandırılırlar (Şekil 7.27). N-bağlı glikoproteinlerde karbohidrat, asparajin yan grubundaki nitrojen atomuna takılır. O-bağlı glikoproteinlerde, treonin veya serin yan grubundaki oksijen atomu karbohidrat için takılma bölgesidir. Bu pozisyonlara doğrudan bağlanan şekerler genellikle N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamindir.

Ökaryot hücrelerdeki glikoproteinlerin çoğu salgılanma veya plazma zarına katılmak üzere hedeflenmişlerdir. Bu proteinler, genellikle daha sentezleri devam ederken, endoplazmik retikuluma transfer olurlar (sinyal dizileri kesilerek). Endoplazmik retikulumda sentezleri bitmeden glikozillenme de başlar. İlk aşama, yaygın olarak bulunan 14 şekerli bir oligosakkaridin (2 N-asetilglukozamin, 3 glukoz ve 9 mannoz), sentezlenmekte olan polipeptid zincirindeki bir



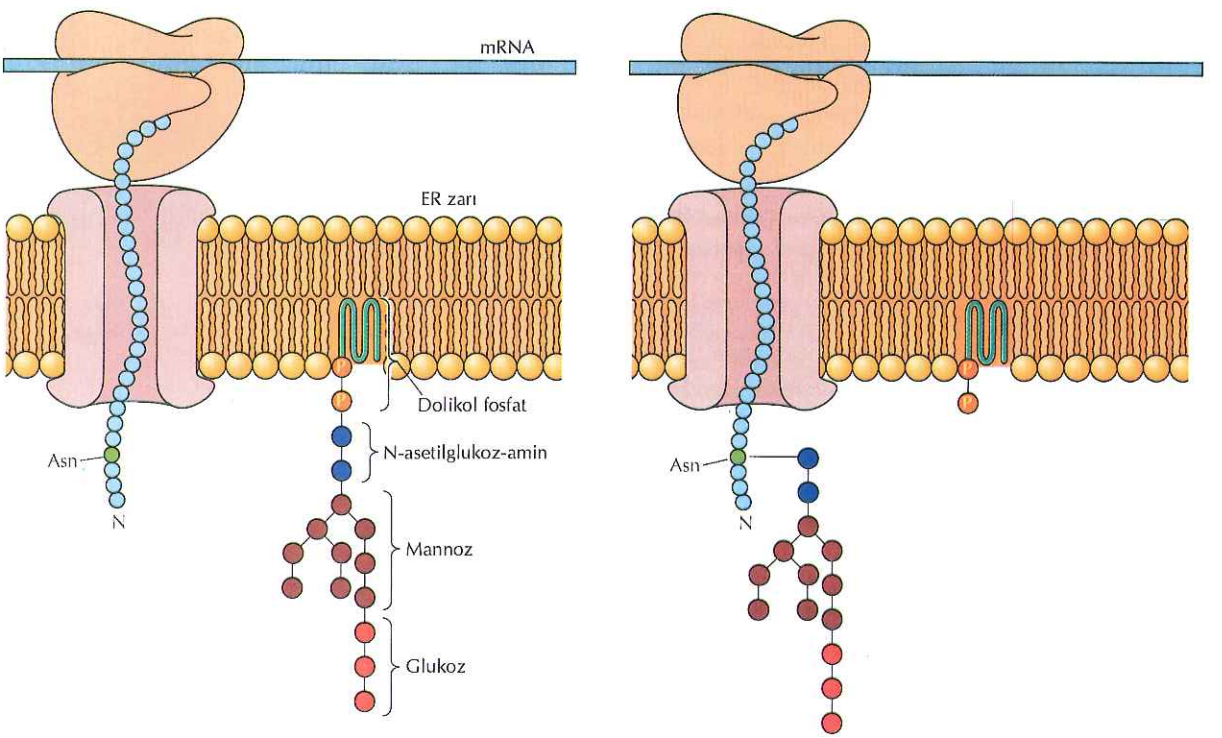
Şekil 7.27 Glikoproteinlere karbohidrat yan zincirlerinin takılması
O-bağlı glikoproteinlerde karbohidrat zincirleri serin (görülmekte) veya treonine takılırken, N-bağlı glikoproteinlerde asparajine takılır. Amino asitlere bağlanan şekerler genellikle N-asetilglukozamin (N-bağlı) veya N-asetilgalaktozamindir (O-bağlı).

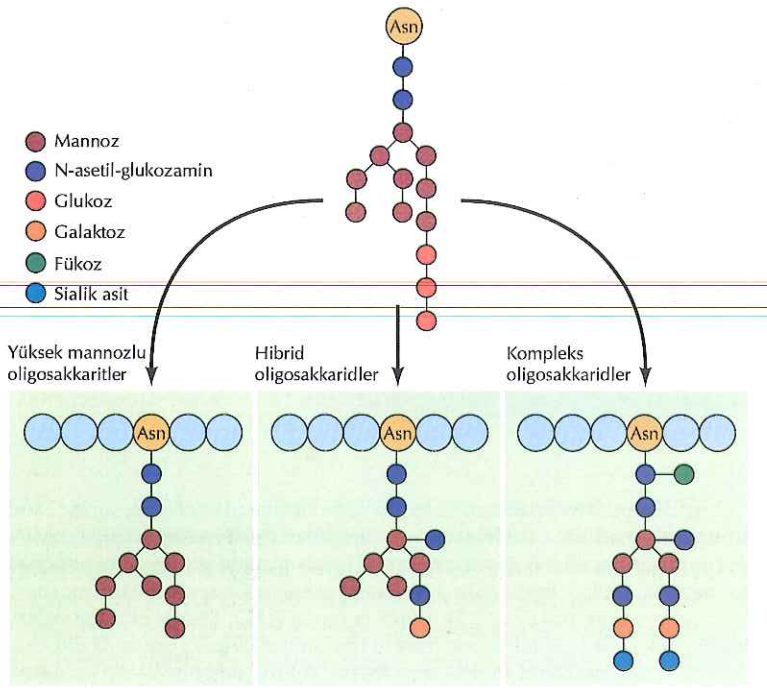
asparajine transferidir (Şekil 7.28). Oligosakkarid endoplazmik retikulumdaki bir lipid taşıyıcı üzerinde (**dolikol fosfat**) eklenir. Daha sonra, bütün bir birim halinde, Asn-X-ser veya Asn-X-thr (X prolin dışında her hangi bir amino asit) dizisindeki asparajine aktarılır.

Daha sonraki bir işlemle, ortak N-bağlı oligosakkarid değiştirilir. Bir mannoz ve 3 glukoz birimi, glikoprotein endoplazmik retikulumda iken, uzaklaştırılır. Daha sonra glikoprotein, endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına transfer olduğunda, oligosakkarid modifiye edilir. Karbohidratların eklenmesini veya uzaklaştırılmasını kapsayan bu değişim (Bölüm 9'da tartışılacak) Golginin bölmeleri arasındaki aktarım sırasında gerçekleşir (Şekil 7.29). Farklı glikoproteinlerin N-bağlı oligosakkaridleri, farklı hücrelerde var olan enzimlere ve oligosakkaridin, değişimini katalizleyen enzimlere erişimine bağlı olarak, farklı şekilde işlenirler. Ulaşılamayan oligosakkaridlere sahip glikoproteinlere Golgide yeni şekerler eklenmez. Bu glikoproteinlerin nispeten basit olan oligosakkaridleri yüksek mannoz oligosakkaridler olarak adlandırılırlar, çünkü bu glikoproteinler, endoplazmik retikulumda orijinal olarak eklenen genel oligosakkaridlere benzer şekilde, yüksek oranda mannoz içerirler. Buna karşılık oligosakkaridleri ulaşılır olan glikoproteinler, daha yoğun biçimde işlenerek çeşitli kompleks oligosakkaridlerin oluşumuna yol açarlar.

O-bağlı oligosakkaridler de Golgi aygıtı içerisinde eklenir. N-bağlı oligosakkaridlere karşılık, O-bağlı oligasakkaritler birkaç şeker

Şekil 7.28 N-bağlı glikoproteinlerin sentezi
Glikozillenmede ilk adım, uzayan polipeptid zincirine endoplazmik retikulumda (ER) 14 şekerden oluşan oligosakkaridin ilavesidir. Oligosakkarid (iki N-asetilglukozamin, dokuz mannoz ve üç glukoz ünitesinden oluşur) ER zarında lipid taşıyıcısı (dolikol fosfat) ile birleşir. Daha sonra tek birim olarak polipeptidin alıcı asparajinine aktarılır.





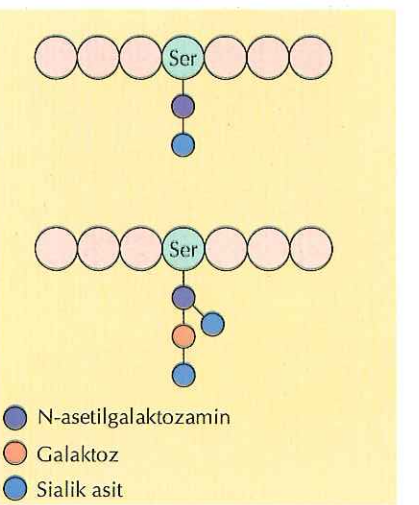
Şekil 7.29 N-bağlı oligosakkarid örnekleri
Çeşitli oligosakkaridler, endoplazmik retikulumda başta ilave edilen 14 şekerlik ortak birimin modifikasyonu ile oluşur (bkz. Şekil 7.28). Yüksek mannozlu oligosakkaridlerde glukozlar ve bazı mannoz birimleri uzaklaştırılır ancak başka şeker ilave edilmez. Kompleks oligosakkaridlerin sentezinde, daha fazla mannoz uzaklaştırılır ve diğer şekerler ilave edilir. Hibrid oligosakkaridler, yüksek mannozlu ve kompleks oligosakkaridler arasında bir üründür. Görülen yapılar temsili örneklerdir.

biriminin, her seferinde teker teker eklenmesi ile oluşurlar (Şekil 7.30). Çeşitli transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere birçok sitoplazmik ve nükleer protein de, farklı enzim sistemleri tarafından katalizlenen tek bir O-bağlı N-asetilglukozamin ilavesi ile değiştirilirler. Bununla birlikte sitoplazmik ve nükleer glikoproteinlerin fonksiyonunda karbohidratların rolü hala anlaşılamamıştır.

Lipidlerin Takılması

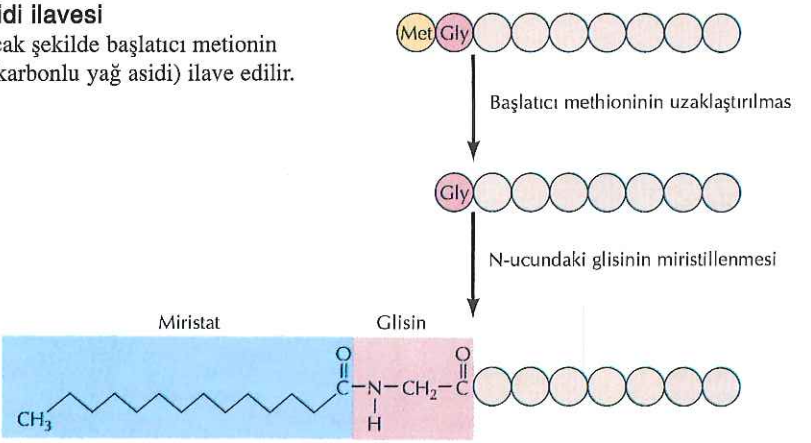
Ökaryot hücrelerde bazı proteinler polipeptid zincirine lipid takılması ile modifiye olurlar. Hidrofobik lipidler zarlarla etkileşebildikleri için bu değişiklikler, proteinleri plazma zarına yönlendirir ve yerleştirir (bkz. Şekil 2.48). Plazma zarının sitozolik yüzü ile ilişkili olan ökaryot proteinlerinde; palmitoillenme, prenillenme ve N-miristillenme olmak üzere üç genel tipte lipid eklentisi yaygındır. Dördüncü bir modifikasyon glikolipidlerin ilavesidir ki, hücre yüzey proteinlerini, plazma zarının hücre dışına bakan yüzüne yerleştirmede önemli rol oynar.

Bazı proteinlerde, proteine çevrim sırasında uzamakta olan polipeptid zincirinin amino ucuna bir yağ asidi takılır. **N-miristillenme** olarak adlandırılan bu işlemde, miristik asit (14 karbonlu bir yağ asidi) N-ucu glisin birimine takılır (Şekil 7.31). Glisin genellikle polipeptid zincirine katılan ikinci amino asittir, yağ asidi eklenmesinden önce başlatıcı metionin proteolitik kesimle uzaklaştırılır. N-miristoillenerek değişen birçok protein plazma zarının iç yüzü ile ilişki halindedir ve bu ilişkide yağ asitlerinin rolü, N-ucu glisinin, alanin ile değiştiği mutant proteinlerin analizi ile gösterilmiştir. Bu yer değiştirme miristillenmeyi önler ve proteinin zar



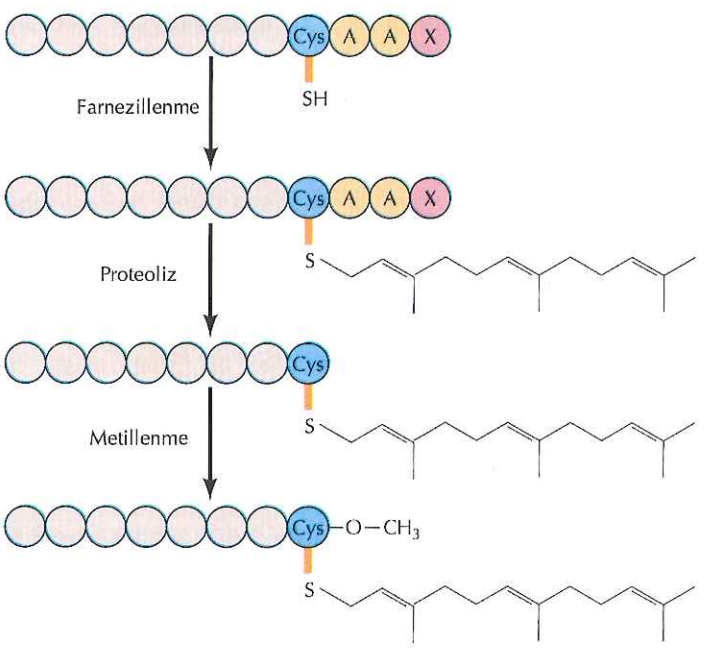
Şekil 7.30 O-bağlı oligosakkarid örnekleri
O-bağlı oligosakkaridler, genellikle, şekerlerin birer birer eklendiği birkaç karbohidrat ünitesinden oluşur.

Şekil 7.31 N-miristillenme ile yağ asidi ilavesi
Polipeptid zincirinin N-ucunda glisin kalacak şekilde başlatıcı metionin uzaklaştırılır. Daha sonra miristik asit (14 karbonlu yağ asidi) ilave edilir.



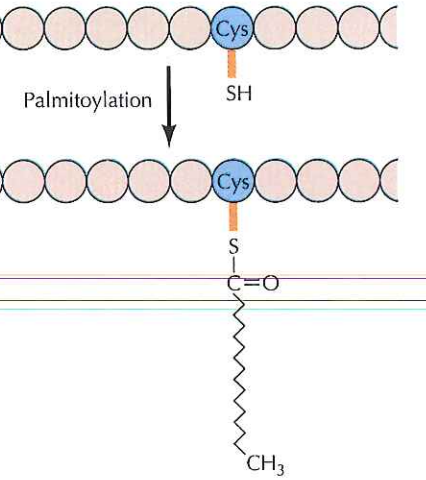
ile ilişkisini inhibe ederek mutant proteinlerin fonksiyonlarını bloklar.

Lipidler sistein, serin ve treonin amino asitlerinin yan zincirlerine de bağlanabilir. Bu tipde modifikasyonun önemli bir örneği **prenillenmedir**. Burada özgül tipte lipidler (prenil grupları), polipeptid zincirinin C-ucuna yakın bölgede yerleşik sisteinlerin kükürt atomuna bağlanırlar (Şekil 7.32). Çeşitli insan kanserlerindeki kontrolsuz çoğalmadan sorumlu olan Ras onkogen proteini de dahil olmak üzere hücre çoğalma ve farklılaşmasının kontroluna katılan plazma zarı ile ilişkili birçok protein bu şekilde modifiye olur (bkz. Bölüm 15). Bu proteinlerin prenillenmesi üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak, prenil grubu, polipeptid zincirinin karboksi ucundan üç amino asit önce yer alan sisteine eklenir. Bu reaksiyonda takılan prenil grubu ya farnezil (Şekil 7.32 de görüldüğü gibi 15 karbonlu) ya da geranildir (20 karbonlu). Daha sonra sisteini takibeden amino asitler uzaklaştırılır ve sistein karboksi ucunda kalır. Son olarak C-ucundaki sistein amino asidinin karboksil grubuna metil grubu eklenir.



Şekil 7.32 C–ucu sisteinlerin prenillenmesi
Prenillenmenin tipi Ras proteinlerini ve çekirdek zarfını (nükleer laminler) etkiler. Bu proteinler C-ucunda sistein (Cys) ve onu takip eden iki alifatik amino asit (A) ve herhangi bir amino asit (X) ile sonlanır. Modifikasyonlarındaki ilk aşama, 15 karbonlu farnezil grubunun sisteinin yan zincirine ilavesidir (farnezillenme). Bu aşamayı, C-ucundaki üç amino asidin proteolitik olarak uzaklaştırılması ile, C-ucunda yer alan sisteinin metillenmesi izler.

Şekil 7.33 Palmitillenme
Palmitat (16 karbonlu bir yağ asidi) içteki bir sisteinin yan zicirine eklenir.



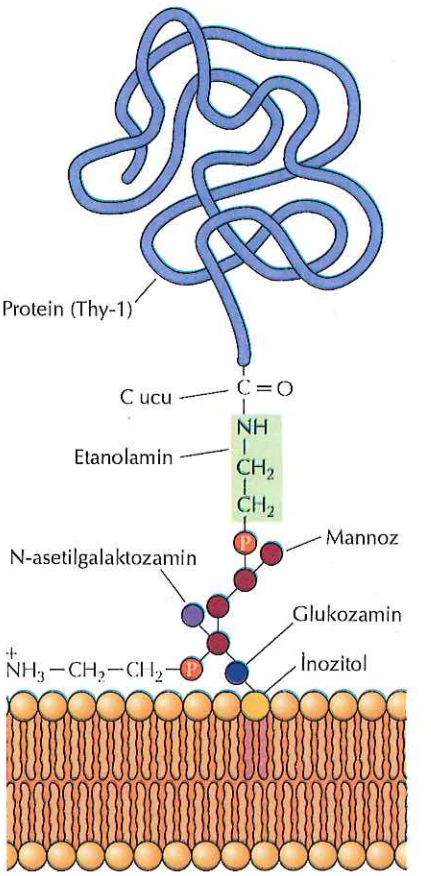
Prenillenmenin biyolojik önemi, kritik bölgedeki sistein mutasyonunun Ras proteinlerinin zar bağlantısını ve fonksiyonlarını engellediğini gösteren çalışmalarla belirlendi. Farnezillenme, hücresel proteinlerde göreli nadir bir modifikasyon olduğu için, bu işlemin anahtar enziminin (farnezil transferaz) olası inhibitörlerinin Ras proteinin işe karıştığı kanserlerin tedavisinde bir ilaç olarak kullanılma olasılığı çalışmalarını hızlandırmıştır. Farnezillenme inhibitörleri, deneysel modellerde kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği belirlenmiştir, insan tümörlerindeki etkinliği ise klinik uygulamalarla değerlendirilme aşamasındadır.

Üçüncü bir yağ asidi modifikasyon tipi; 16 karbonlu palmitik asidin iç sisteinlerin yan grubundaki kükürt atomlarına eklenmesiyle gerçekleşen **palmitillenmedir** (Şekil 7.33). N-miristillenme ve prenillenme gibi, palmitillenme de bazı proteinlerin plazma zarının sitozolik yüzüne bağlanmasında önemli rol oynar

Son olarak, oligosakkaridlere bağlı lipidler (**glikolipidler**), bazı proteinlerin C-ucu karboksil grubuna eklenerek, bu proteinlerin plazma zarının dış yüzüne yerleşmeleri sağlanır. Bu proteinlere takılı olan glikolipidler, fosfotidilinositol içerdikleri için, genellikle **glikozilfosfotidilinositol** veya **GPI** çapası olarak adlandırılırlar (Şekil 7.34). GPI'ların oligosakkarid kısmı, polipeptid zincirlerinin uç karboksil gruplarına bağlıdır. Fosfotidilinositolün inositol grubu da oligosakkaride bağlanır, böylece karbohidratlar fosfolipidlerin yağ asidi ve proteinleri arasında köprü görevi görürler. GPI bağlaçları tam yapılanmamış birimler olarak endoplazmik retikulumda sentezlenir ve proteinlere eklenir. Bunların eklenmesi, polipeptid zincirinin C-ucundan yaklaşık 20 amino asitlik peptidin kesimi ile birliklikte gelişir. Daha sonra GPI gruplarındaki yağ asidi zincirlerinin plazma zarına bağlanmayı yönlendirmesi ile, değiştirilmiş proteinler hücre yüzeyine taşınırlar.

Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Proteinlerin en önemli işlevlerinden biri, tüm biyolojik reaksiyonların katalizi için gerekli olan enzim aktiviteleridir. Böylece enzim aktivitesinin düzenlenmesi, hücre davranışlarını belirlemede anahtar rol oynar. Hücre bunu kısmen sentezlenecek enzim (protein) miktarını belirleyecek gen ifadesi düzeyinde başarır. Daha ileri düzeyde bir kontrol ise proteinlerin sadece miktarını değil aynı zamanda aktivitelerini de kontrol etmeye imkan veren protein işlevinin denetimi ile sağlanır. Translasyon ve transkripsiyon süreçlerine katılan proteinlerin bir kısmının, aktivitelerinin düzenlenmesi ve hücre davranışlarının kontrolunda rol alan kontrol edilebilir proteinlerin bir



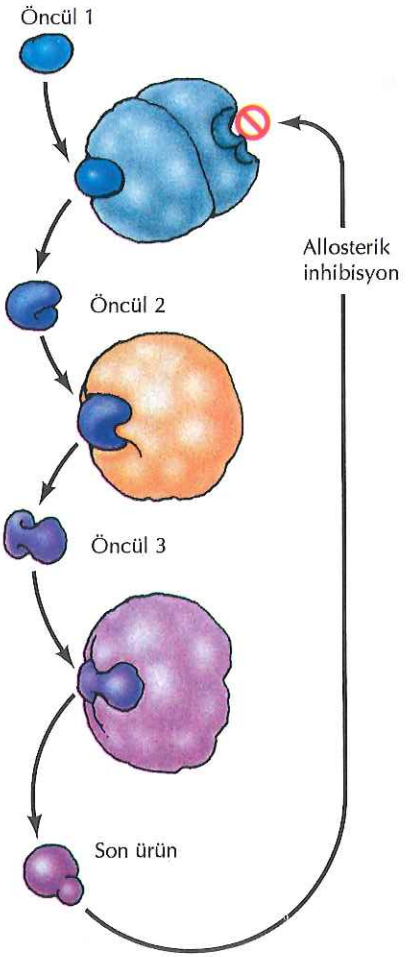
Şekil 7.34 GPI çapasının yapısı
C-ucuna takılan GPI çapası, proteini plazma zarına yerleştirir. Bu bağlantı grubu C-ucundaki amino aside, mannoz, N-asetil galaktozamin ve glukozamin birimlerinden oluşan oligosakkaride bağlı etanolamin aracılığı ile tutunur. Oligosakkarid de, fosfotidilinositolun inositol grubuna bağlanır. Lipidin iki yağ asidi zinciri de plazma zarına gömülür. Burada görülen GPI çapası, sıçan proteini Thy-1'e aittir.

çok örneği daha önceki ve sonraki bölümlerde tartışılmıştır. Bu bölümde hücresel proteinlerin kontrolundaki üç genel mekanizma tartışılmaktadır.

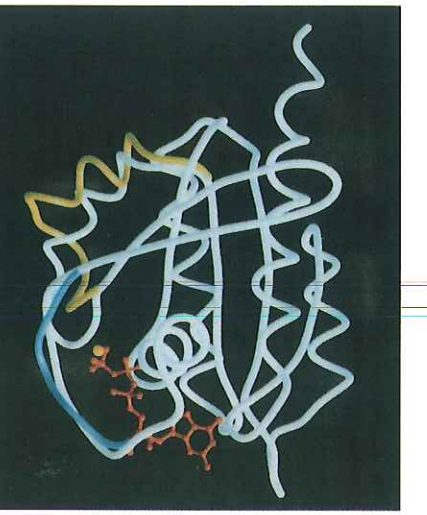
Küçük Moleküllerle Düzenlenme

Enzimlerin çoğunun katalitik aktiviteleri, konformasyon değişimleri ile kontrol edilmektedir. Birçok durumda bu konformasyonel değişim enzim aktivitesini düzenleyen nükleotidler veya amino asitler gibi küçük moleküllerin bağlanması sonucunda ortaya çıkar. Bu tip düzenlenme genellikle, geriye-tepki inhibisyonu yoluyla kontrolden sorumludur. Örneğin, biyosentez yolaklarının bir çoğunda, son ürün (örn., amino asitler) kendi sentez yolağındaki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder, böylece gereksiz miktarda sentezi önleyerek yeterli miktarda ürün sağlanmasını garantiler (Şekil 7.35). Geriye-tepki inhibisyonu, enzimin katalitik bölgesi dışında bir yere düzenleyici molekülün bağlanması ile ortaya çıkan **allosterik düzenlenmeye** (allo=diğer, sterik=bölge) örnektir. Bunun gibi düzenleyici moleküllerin bağlanması, proteinin üç boyutlu yapısını değiştirir ve böylece, katalitik bölgenin şekli değiştiği için katalitik aktivite etkilenir (bkz. Şekil 2.29). Birçok transkripsiyon faktörü de (Bölüm 6'da tartışıldı), küçük moleküllerin bağlanması ile kontrol edilir. Örneğin, laktozun *E. coli lac* represörüne bağlanması, represörün DNA'ya bağlanmasını engelleyen biçimsel değişimi uyarır. Ökaryot hücrelerde steroid hormonlar, benzer şekilde, transkripsiyonu düzenleyen proteinlere bağlanarak gen ekspresyonunu denetlerler.

EF–Tu gibi protein çevirim faktörlerinin GTP bağlanması ile regülasyonu (bkz. Şekil 7.13), hücresel proteinlerin aktivitelerinin kontrolunda diğer bir yaygın mekanizmadır. Bu durumda, proteinin GDP bağlı formu inaktif iken, GTP bağlı formu aktif şeklidir. Bir çok hücresel protein benzer şekilde GTP veya GDP bağlanması ile düzenlenir. Bu proteinler arasında, hücre çoğalmasının kontrolü ve insan kanserlerindeki rolü nedeni ile yoğun bir şekilde çalışılan, Ras onkogen proteini de bulunur. Bu proteinlerin X-ışını kristallografileri, GTP-bağlı aktif ve GDP- bağlı inaktif biçimleri arasında, küçük fakat fonksiyonel olarak çok önemli, farklar olduğunu açığa çıkarmıştır (Şekil 7.36). Protein konformasyonundaki bu küçük farklılık, Ras'ın (aktif, GTP-bağlı formda) hücre bölünmesini uyaran hedef molekülle etkileşip etkileşemeyeceğini belirlemektedir. Protein üç boyutlu şeklindeki bu küçük farklılığın önemi, *ras* genindeki mutasyonların insan kanserlerinin %20'sinin gelişimine katkıda bulunduğu gerçeği ile çarpıcı biçimde gösterilmiştir. Böyle mutasyonlar Ras proteininin konformasyonunu öyle değiştirir ki, protein GTP-bağlı aktif konformasyona kilitlenir ve sürekli bölünme sinyali ileterek kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesine yol açar. Buna karşın, normal Ras proteini GTP ve GDP-bağlı konformasyonlar arasında değişim gösterir ve böylece, çok hücreli organizmalarda, sadece normal çoğalmayı denetleyen büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından uyarılmayı takiben aktifleşir.



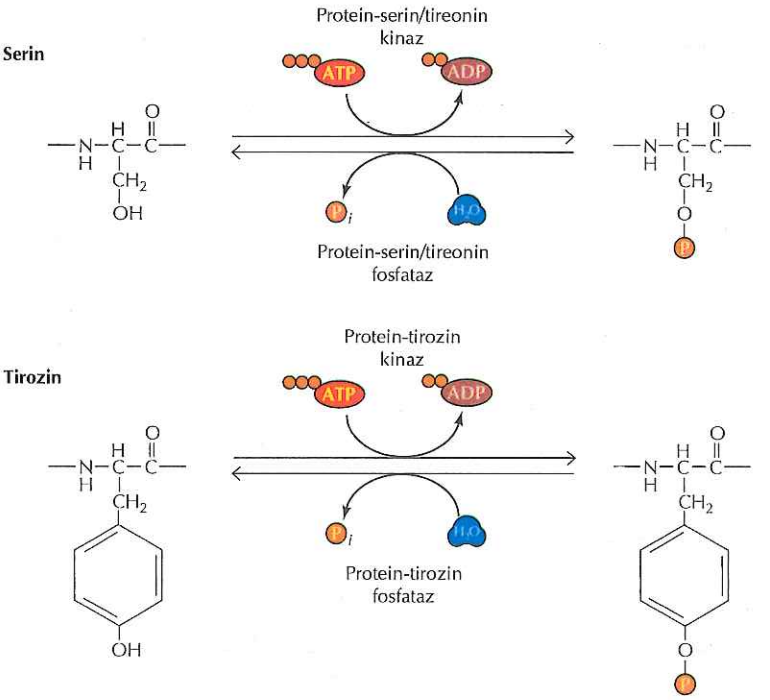
Şekil 7.35 Geriye tepki inhibisyonu
Bir biyokimyasal yolun son ürünü, sentez yolunda ilk basamağı katalizleyen enzimin allosterik inhibitörü olarak etki eder.



Şekil 7.36 Aktif ve inaktif Ras proteinleri arasındaki konformasyon farkları
Ras proteinleri GTP-bağlı aktif ve GDP-bağlı inaktif formlar arasında değişim gösterir. GTP bağlanmasına karşı GDP bağlanmasının majör etkisi, molekülün şalter I ve II bölgeleri olarak adlandırılan iki bölgesindeki konformasyon değişikliğidir. Burada, GTP kompleksinin omurgası beyazla, GDP kompleksinin şalter I ve II omurgası sırası ile mavi ve sarı ile gösterilmiştir. Guanin nükleotid kırmızı ve Mg^{+2} sarıdır. (Uniersity of California, Berkley'den Sung-Hou Kim'in izni ile)

Protein Fosforillenmesi

Bir önceki bölümde tartışılan örnekler, inhibitör veya aktivatör nitelikli küçük moleküllerle proteinlerin kovalent olmayan ilişkileri idi. Kovalent bağ oluşmadığı için, bu regülatör moleküllerin proteinlere bağlanması, hücrelerin çevresel değişimlere hızlı cevap vermesine imkan verecek şekilde, kolayca geri dönüşebilir. Bununla birlikte birçok proteinin aktivitesi kovalent modifikasyonlarla da düzenlenir. Bu tipte düzenlemenin bir örneği, bazı enzimlerin inaktif öncüllerinin proteolitik kesim ile aktivasyonudur. Bu bölümde daha önce de belirtildiği gibi sindirim enzimleri ve kan pıhtılaşmasına katılan proteinler bu mekanizma ile kontrol edilirler. Proteoliz geri dönüşümsüz olduğu için, enzim aktivitesini çevresel değişimlere cevap olarak açıp kapamak yerine, enzim aktivasyonunun kontrolünü sağlar. Buna karşılık diğer kovalent değişimler–özellikle fosforillenme– allosterik düzenlemede olduğu gibi kolayca geri dönüşebilir ve çevresel sinyallere cevap olarak çok çeşitli hücresel proteini, geri dönüşümlü şekilde, aktive veya inhibe ederler. Protein fosforillenmesi, fosfat grubunu ATP'den serin, tireonin veya tirozinin yan zincirlerindeki hidroksil grubuna transfer eden **protein kinazlar** tarafından katalizlenir (Şekil 7.37). Protein kinazlar ökaryotlarda genlerin yaklaşık %2'sine karşı gelen en büyük gen ailesidir. Protein



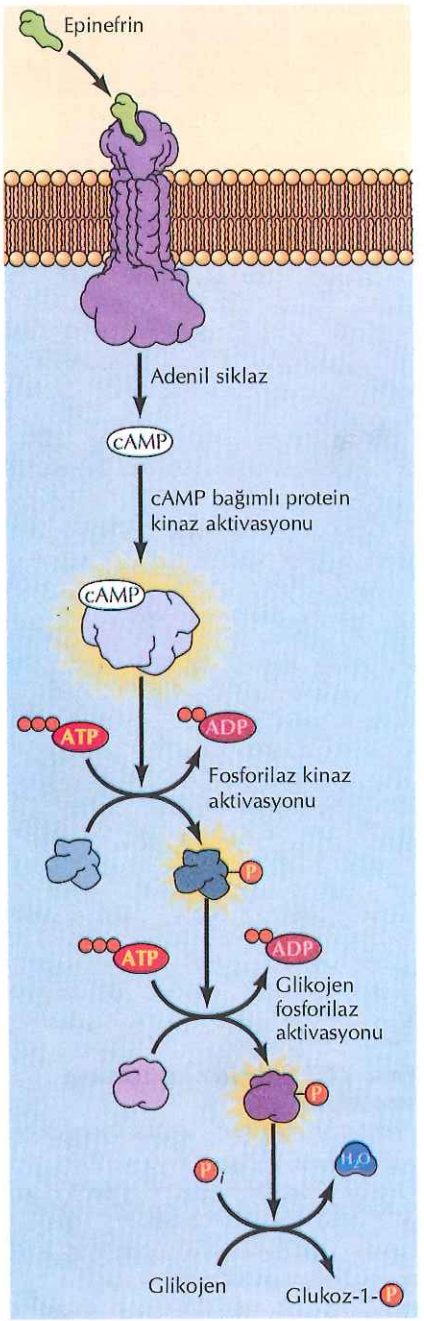
Şekil 7.37 Protein kinazlar ve fosfatazlar
Protein kinazlar, serin ve tireonin (protein serin/tireonin kinazlar) veya tirozin (protein tirozin kinazlar) yan zincirlerine ATP'den fosfat grubu transferini katalizlerler. Protein fosfatazlar aynı amino asitlerden hidrolizle fosfat gruplarının uzaklaştırılmasını katalizlerler.

kinazların çoğu serin, tireonin veya tirozin amino asitlerinden fosfatlar: Bu enzimler, sırasıyla, **protein–serin/treonin kinazlar** veya **protein tirozin kinazlar** olarak adlandırılırlar. Protein fosforilasyonu, fosfatlanmış amino asitlerin hidrolizini katalizleyen **protein fosfatazlar** tarafından geri dönüştürülebilir. Bazı protein fosfatazlar her üç fosfoamino asidi tanımakla birlikte, fosfatazların çoğu, protein kinazlar gibi, serin, treonin veya tirozine özgüldür.

Protein kinaz ve protein fosfatazların birlikte çalışması ile bir çok hücresel proteinin tersinir fosforilasyonu gerçekleşir. Protein kinazlar sıklıkla sinyal iletim yolunun elemanları olarak fonksiyon görürler, yani, bir kinazın aktivasyonu ikinci ve diğer kinazların üzerinde de etkili olur. Çevresel uyarıya cevap olarak hücre davranışının değişimi ile sonlanacak bir sinyal, bir seri protein kinazın dizi halindeki faaliyeti ile hücre yüzeyinden hücre içindeki hedef proteinlere iletilir. Protein kinazların ilk örneği, 1955'de Ed Fischer ve Ed Krebs'in glikojen metabolizması çalışmalarından gelmiştir. Kas hücrelerindeki yüksek kas aktivitesi için enerji kaynağı sağlamak üzere, epinefrin (adrenalin) hormonu glikojenin glukoz-1- fosfata yıkılması için sinyal oluşturur. Glikojenin yıkımı bir protein kinaz tarafından düzenlenen glikojen fosforilaz tarafından katalizlenir (Şekil 7.38). Epinefrin hücre yüzeyi reseptörüne bağlanarak ATP'nin siklik AMP (cAMP) ye dönüşümünü tetikler, bu da daha sonra cAMP bağımlı protein kinaz adı verilen bir protein kinaza bağlanır ve onu aktive eder. Bu kinaz, fosforilaz kinaz adı verilen ikinci bir protein kinazı fosfatlar ve aktive eder. Fosforilaz kinaz sırası ile glikojen fosforilazı fosforile ve aktive ederek glukoz üretimine yol açar. Fosforilaz kinaz ve glikojen fosforilazın her ikisinin de aktive edici fosforilasyonları, özgül fosfatazlarla geri dönüşebilir böylece ilk uyarının (epinefrin) uzaklaştırılması daha fazla glikojen yıkımını inhibe eder.

Glikojen fosforilazın aktivasyonuna yol açan sinyal yolağı, küçük moleküllerin hücre yüzeyine bağlanması ile başlar-cAMP'nin cAMP bağımlı protein kinaza, epinefrinin reseptörüne bağlanması gibi. Sinyal daha sonra protein kinazların ardışık etkileri ile hücre içi hedeflere iletilir. Protein kinaz ve fosfatazların esas rol oynadığı benzer sinyal yolakları, ökaryot hücrelerin davranışlarının hemen her yönünde regülasyonu için geçerlidir (bkz. Bölüm 13 ve 14). Bu yolaklarda, genellikle protein kinaz hataları şeklindeki bozukluklar, başta kanser gelişimi olmak üzere bir çok hücre büyüme ve farklılaşma bozuklukları ile ilişkili hastalıklara neden olur.

Her ne kadar protein aktivitesini düzenleyen en yaygın ve en çok çalışılan kovalent modifikasyon fosforilasyon ise de, proteinlerin diğer modifikasyonları da önemli roller oynar. Bunların arasında; lizinlerin asetilasyonu ve metilasyonu (Bölüm 6'da tartışıldı) ile, sisteinlerin yan gruplarına NO gruplarının eklenmesi de (nitrozilasyon) sayılabilir. Ek olarak, nükleer ve sitozolik proteinlerin O-bağlı glikozilasyonunun da düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir.



Şekil 7.38 Protein fosforillenmesi ile glikojen yıkımının düzenlenmesi

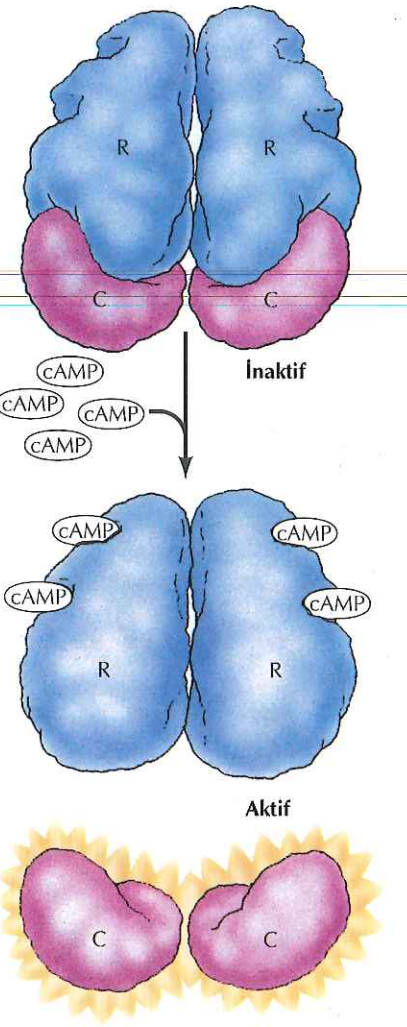
Epinefrinin (adrenalin) hücre yüzeyi reseptörüne bağlanması, siklik AMP (cAMP) yapımını tetikler ki bu da, cAMP- bağımlı protein kinazı aktive eder. cAMP bağımlı protein kinaz daha sonra, fosforilaz kinazı fosfatlayarak aktive eder o da, glikojen fosforilazı fosforilleyerek aktive eder. Daha sonra glikojen fosforilaz, glikojenin glukoz 1-fosfata yıkımını katalizler.

Protein – Protein Etkileşimleri

Proteinlerin çoğu, her biri bağımsız polipeptid zinciri olan birden fazla alt birimden oluşur. Bazı proteinlerde bu alt birimler özdeştir, diğerleri ise iki ya da daha fazla birbirinden farklı alt birimden oluşurlar. Her iki durumda da, polipeptid zincirleri arasındaki ilişki protein aktivitesinin regülasyonu için önemlidir. Bu ilişkilerin önemi, regülatör moleküllerin bağlanması ile alt birimlerin etkileşimlerinin değiştiği allostrerik enzimlerde gösterilmiştir.

Diğer birçok enzim de benzer şekilde protein-protein etkileşimi ile regüle edilmektedir. İki katalitik ve iki regülatör alt birimden oluşan cAMP- bağımlı kinaz bu duruma iyi bir örnek oluşturur (Şekil 7.39). Başlangıçta, regülatör alt birimler katalitik alt birimlerin aktivitesini engellediğinden, enzim inaktiftir. Enzim, regülatör alt birimlere bağlanan ve konformasyonal değişime yol açarak kompleksin ayrışmasına neden olan cAMP tarafından aktive edilir ve serbest katalitik alt birimler artık aktif protein kinazlardır. Böylece, cAMP proptein-protein etkileşimlerini değiştirerek allosterik regülatör olarak rol oynar.

Bölüm 6'da tartışılan, transkripsiyonun regülatör proteinleri de protein-protein etkileşimine önemli bir örnek oluştururlar. Ökaryot transripsiyon faktörlerinin çoğu genel transkripsiyon mekanizmasının elemanları ile protein-protein ilişkisi üzerinden aktivatör veya represör olarak işlev görür. Daha sonraki bölümlerde tartışılacağı gibi, kendileri de üzerlerine bağlanan küçük moleküller ve fosforilasyonla düzenlenen proteinler, benzer şekildeki protein-protein etkileşimleri yoluyla hücre davranışının çeşitli yönlerinin kontrolunda kritik rol oynarlar.



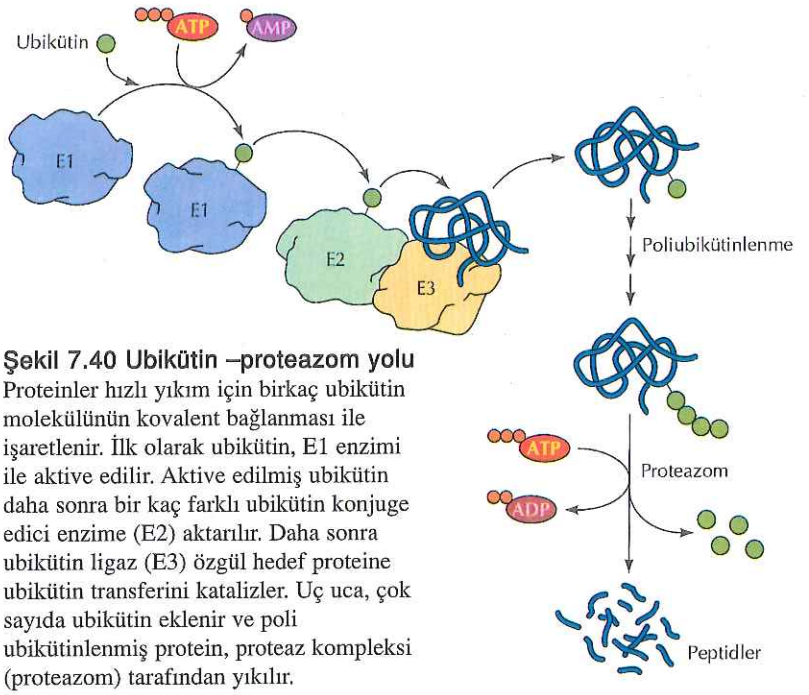
Şekil 7.39 cAMP- bağımlı protein kinazın düzenlenmesi
İnaktif durumdaki enzim iki düzenleyici (R) ve iki katalitik (C) alt birimden oluşur. Siklik AMP düzenleyici alt birime bağlanır ve konformasyonel değişikliği uyararak katalitik alt birimden ayrılmasına neden olur. Serbest katalitik alt birimler ise enzimatik olarak aktiftir.

Protein Yıkımı

Hücre içindeki proteinlerin düzeyi sadece onların sentez hızı ile değil aynı zamanda yıkım hızı ile de kontrol edilir. Proteinlerin hücre içindeki yarı ömrü, dakikalardan birkaç güne kadar büyük değişim gösterir ve protein yıkımının farklı hızları hücre regülasyonunun önemli bir kavramıdır. Transkripsiyon faktörleri gibi çabuk yıkılan çoğu protein regülatör molekül olarak işlev görürler. Bu proteinlerin hızlı dönüşümü, çevreden gelen uyarılara hızlı cevap verebilmek için gereklidir. Özgül sinyallere cevap olarak çabuk yıkılan diğer proteinler ise, hücre içi enzim aktivitesinin regülasyonu için diğer bir mekanizma oluştururlar. İlave olarak, hücre içindeki hatalı veya hasarlı proteinler süratle tanınır ve yıkılır, böylece, protein sentezi sırasında oluşan hatalar süratle uzaklaştırılmış olur. Ubikütin-proteazom ve lizozomal proteoliz olmak üzere protein yıkımını sağlayan iki ana yol vardır.

Ubikütin – Proteazom Yolu

Ökaryot hücrelerde, en önemli, seçili protein yıkım yolu, sitozolik ve nükleer proteinleri süratle yıkabilmek için **ubikütin** belirleyici olarak kullanır (Şekil 7.40). Ubikütin, tüm ökaryotlarda (maya, hayvanlar ve bitkiler) ileri derecede korunmuş 76 amino asitlik bir polipeptiddir. Proteinler, lizinlerin yan zincirindeki amino gruplarına ubikütin takılması ile yıkım için işaretlenirler. Daha sonra çoklu ubikütin zincirleri oluşturmak üzere ek ubikütinler eklenir. Böylece multi ubikütinlenmiş proteinler, **proteazom** adı verilen çok alt birimli proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkılırlar. Bu işlem sırasında ubikütinler serbest kalır ve daha sonra başka bir döngüde tekrar



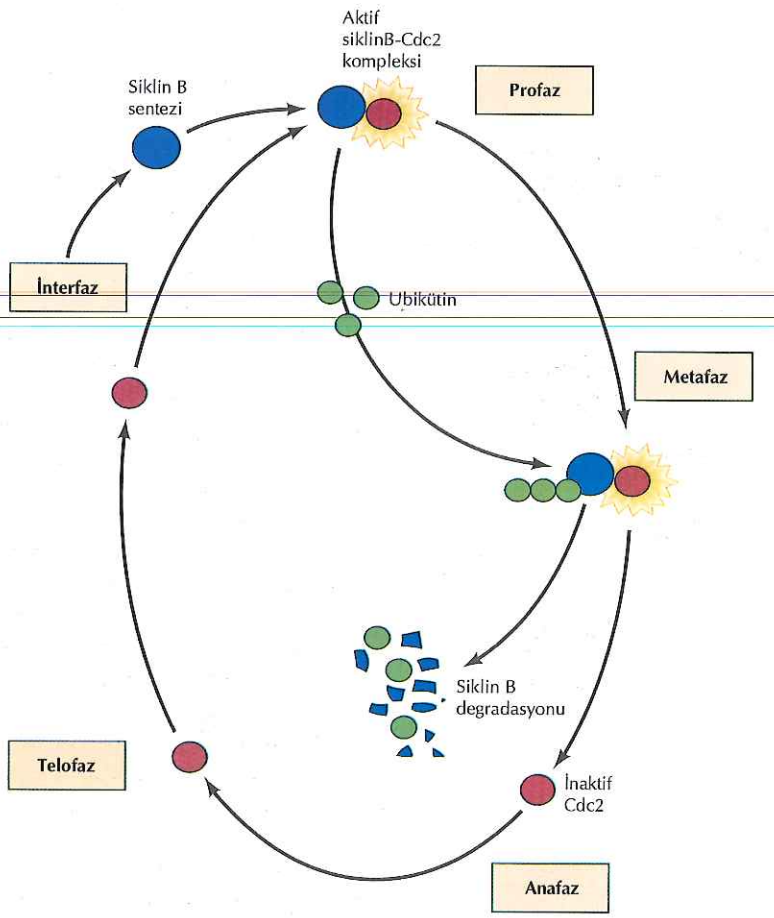
Şekil 7.40 Ubikütin –proteazom yolu
Proteinler hızlı yıkım için birkaç ubikütin molekülünün kovalent bağlanması ile işaretlenir. İlk olarak ubikütin, E1 enzimi ile aktive edilir. Aktive edilmiş ubikütin daha sonra bir kaç farklı ubikütin konjuge edici enzime (E2) aktarılır. Daha sonra ubikütin ligaz (E3) özgül hedef proteine ubikütin transferini katalizler. Uç uca, çok sayıda ubikütin eklenir ve poli ubikütinlenmiş protein, proteaz kompleksi (proteazom) tarafından yıkılır.

kullanılırlar. Hem ubikütinlerin bağlanması hem de markalanmış proteinlerin yıkımı ATP enerjisine gereksinir.

Ubikütin bağlanması proteinleri süratli yıkım için işaretlediğinden, bir çok proteinin stabilitesi ubikütinlenmeye bağlı olarak belirlenir. Ubikütinlenme çok aşamalı bir süreçtir. İlk olarak ubikütin, ubikütin aktive edici enzim E 1'e bağlanarak aktive olur. Daha sonra ubikütin, ubikütin-konjuge edici enzim adı verilen (E2) ikinci bir enzime transfer olur. Son olarak ubikütinin hedef proteine transferi, uygun sübstrat proteinin tanınması ve seçilmesinden de sorumlu olan, ubikütin ligaz veya E3 adındaki üçüncü bir enzim tarafından gerçekleştirilir. Hücrelerin çoğu tek bir E1 bulundurur ancak bir çok E2 ve çok sayıda E3 enzimlerine sahiptir. Farklı E3'ler farklı sübstrat proteinlerini tanırlar ve bu enzimlerin özgüllüğü, hücresel proteinleri seçili olarak ubikütin-proteazom yoluna hedefler.

Gen ekspresyonu ve hücre çoğalması gibi temel hücresel süreçleri kontrol eden proteinler, kontrollü ubikütinlenme ve proteolizin hedefleridir. Bu tip kontrollü yıkıma ilginç bir örneği, ökaryot hücrelerde bölünme döngüsünün ilerlemesini denetleyen proteinler (siklinler olarak bilinir) oluşturur (Şekil 7.41). Tüm ökaryot hücrelerin mitoza girmesi, kısmen, Cdc2 olarak adlandırılan bir protein kinazın regülatör alt birimi olan siklin B tarafından kontrol edilir (bkz. Bölüm 14). Siklin B'nin Cdc2 ile birleşmesi, çeşitli hücresel proteinleri (kromozom yoğunlaşması ve nükleer zar yıkımı dahil olmak üzere) fosfatlayarak mitozu başlatan Cdc2 kinazın aktivitesi için gereklidir. Cdc2 aynı zamanda, mitozu sonlandırmak üzere siklin B'yi yıkacak ubikütine bağlı proteoliz sitemini de aktive eder. Böylece siklin B'nin yıkılması Cdc2'yi inaktive eder ve hücrelerin mitozdan çıkıp bir sonraki hücre döngüsü için interfaza geçmesine olanak sağlar. Yıkım kutusu adı verilen, 9-amino asitlik siklin B dizisi ile hedeflenen çok seçici bir reaksiyondur. Bu dizideki mutasyonlar siklin B yıkımını engeller ve bölünen hücreyi mitozda durdurarak, kontrollü protein yıkımının, hücre bölünmesi gibi temel bir hücresel süreç için ne derece önemli olduğunu gösterir.

Her ne kadar ubikütinlenme proteinleri genellikle yıkım için hedeflerse de, bazı proteinlere ubikütin ilavesinin başka fonksiyonları da vardır. Örneğin bazı proteinlerin ubikütinlenmesi endositoz için işaret oluştururken, histonların ubikütinlenmesi Bölüm 6'da tartışıldığı gibi, bir "histon kodu" elemanıdır. Ayrıca, proteinler çekirdek ve çekirdek içindeki hedeflenme ve yerleşimleri için işaret anlamına gelen SUMO (küçük ubikütin–ilişkili değiştirici) gibi, ubikütin-ilişkili proteinlerin eklenmesiyle modifiye edilebilirler (Bölüm 8'de tartışılacak).



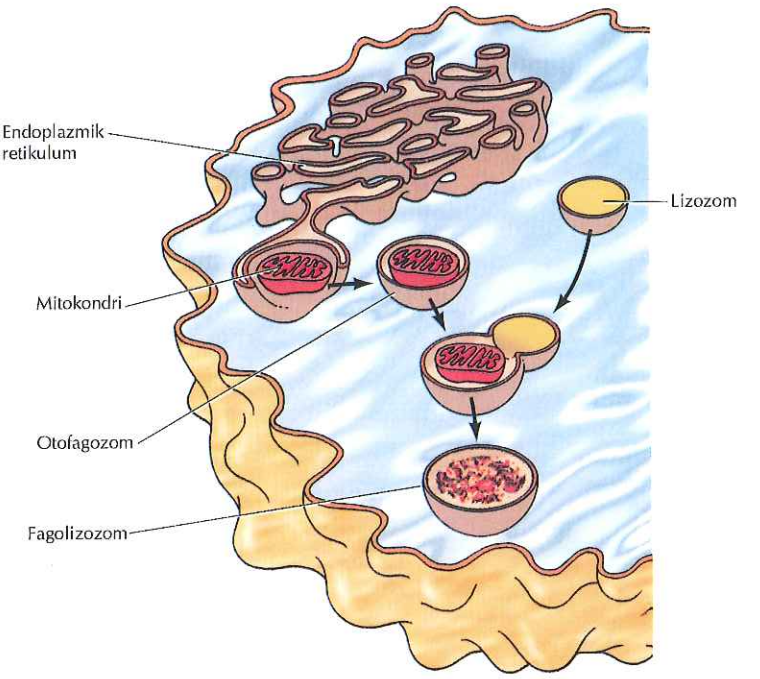
Şekil 7.41 Hücre döngüsünde siklin yıkımı
Ökaryot hücrelerin hücre siklusunda ilerlemesi kısmen, Cdc2 protein kinazın düzenleyici alt birimi olan siklin B'nin sentez ve yıkımı ile kontrol edilir. İnterfazda siklin B'nin sentezi, mitoza girmeyi uyaran aktif/siklin B-Cdc2 kompleksinin oluşumuna yol açar. Daha sonra siklin B nin hızlı yıkımı Cdc2 kinazın inaktivasyonuna neden olur ve hücre mitozdan çıkıp yeni bir döngü için interfaza geri döner.

Lizozomal Proteoliz

Ökaryot hücrelerde diğer bir majör protein yıkım yolu proteinlerin **lizozomlar** tarafından alınması ile gerçekleşir. Lizozomlar, çeşitli proteazların da dahil olduğu bir seri sindirim enzimlerini içeren, zarla çevrili organellerdir (bkz. Bölüm 9). Sitozolik proteinler ve sitoplazmik organellerin yıkılması ve endositozla alınan hücre dışı proteinlerin sindirimi de dahil olmak üzere, hücre metabolizmasında çeşitli rolleri vardır.

Proteazlar ve diğer sindirim enzimlerinin lizozomda tutulması hücre bileşenlerinin kontrolsuz bir şekilde yıkımını önler. Bu nedenle, lizozomal proteoliz ile yıkım için hücresel proteinlerin önce lizozomlar tarafından alınması gerekmektedir. Hücresel proteinlerin alımında, **otofaji**, başlıca yol; endoplazmik retikulum zarından çıkan, bir miktar sitoplazma ve sitoplazmik organel içeren veziküllerin (otofagozom) oluşumudur (Şekil 7.42). Bu veziküller daha sonra lizozomlarla birleşir ve içindekiler lizozomal enzimler tarafından sindirilir. Otofagozomlara proteinlerin alımı seçici değildir, bu nedenle uzun ömürlü sitoplazmik proteinler yavaşça yıkılır.

Otofaji çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında ve besin maddelerinin varlığına cevap olarak düzenlenmektedir. Otofaji genellikle açlık sırasında aktive olmaktadır, böylece hücre gerekli



Şekil 7.42 Lizozom sistemi
Lizozomlar proteazlar da dahil olmak üzere çeşitli sindirim enzimlerini bulundurular. Lizozomlar sitoplazma veya organellerin (mitokondri gibi), endoplazmik retikulum fragmanları içine alınmasıyla oluşan, otofagozomlarla birleşerek, hücresel proteinleri içeri alırlar. Bu füzyon, otofagozom içerisinde alınanları sindirmek üzere fagolizozomları oluşturur.

olmayan protein ve organelleri yıkarak onların bileşenlerini tekrar tekrar kullanıma sokar. Ek olarak otofaji, yeniden doku şekillenmesi ve hücresel bileşenlerin yıkımını içeren böcek metamorfozunda da olduğu gibi, bir çok gelişim sürecinde de önemli rol oynar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

tRNA, antikodon, aminoaçil tRNA sentetaz

Ribozom, rRNA

ÖZET

MESAJCI RNA'nın TRANSLASYONU

Transfer RNA'lar: Transfer RNA'lar amino asitlerin mRNA kalıbına dizilmesi için adaptör rolü oynar. Aminoaçil tRNA sentetazlar amino asitleri, daha sonra komplementer baz eşleşmesi ile mRNA kodonlarına bağlanacak olan uygun tRNA'lara aktarır.

Ribozom: Ribozomlar, rRNA lar ile proteinlerden oluşan iki alt birim içerir. 23S rRNA peptid bağı oluşumunu katalizleyen moleküldür.

mRNA'nın Organizasyonu ve Translasyonun Başlaması: Prokaryot ve ökaryot mRNA'larının her ikisinin de translasyonu metionin ile başlar. Bakteride, başlama kodonunun önünde, mRNA'yı 16sRNA ile baz çifti oluşturarak ribozoma yerleştiren dizi bulunur. Ökaryotlarda, başlama kodonu mRNA'nın 5'ucu taranarak belirlenir ve 7- metilguanozin kep tarafından tanınır.

proteine çevrilmeyen 5' bölgesi, polisistronik, monosistronik, proteine çevrilmeyen 3' bölgesi, Shine-Delgarno dizisi

Translasyon Süreci: Translasyon küçük ribozomal alt birimde mRNA ve metionil tRNA'nın bağlanması ile başlar. Daha sonra büyük ribozomal alt birim bu kompleks ile birleşir ve ribozom mRNA üzerinde bitir kodonuna erişinceye kadar polipeptid zinciri uzamaya devam eder. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda translasyonun başlaması, uzaması ve sonlanması için çok sayıda, ribozom dışı faktörlere gereksinim vardır.

başlama faktörü, uzama faktörü, sonlandırma faktörü, polizom

Translasyonun Düzenlenmesi: Spesifik mRNA'ların translasyonu, represör proteinlerin bağlanması ve proteinlerin mRNA'yı hücrenin özgül bir bölgesine yerleştirmesi ile kontrol edilebilir. Erken gelişim sırasında, mRNA'nın kontrollü poliadenilasyonu da translasyonun kontrolü için önemli bir mekanizmadır. İlave olarak bazı mRNA'ların translasyonu homolog mRNA'ların yıkımını hedefleyen, kodlanmayan RNA interferansı ile kontrol edilir. Son olarak, hücrelerde genel translasyon aktivitesi başlama faktörlerinin modifikasyonu ile de kontrol edilir.

PROTEİN KATLANMASI VE İŞLENMESİ

Şaperonlar ve Protein Katlanması: Moleküler şaperonlar katlanmamış ve kısmen katlanmış polipeptid zincirlerine bağlanarak onları stabilize eder ve polipeptid zincirlerinin doğru üç boyutlu konformasyona katlanmasını kolaylaştırır.

şaperon, ısı-şok proteini, şaperonin

Enzimler ve Protein Katlanması: Protein disülfit izomeraz ve peptidil prolil izomeraz gibi en az iki tip enzim protein katlanmasını katalizlemektedir.

protein disülfid izomeraz, Peptidil prolil izomeraz

Protein Kesimi: Birçok proteinin işlenmesinde proteoliz önemli bir aşamadır. Örneğin, salgılanan ve ökaryot organellere katılan proteinler, zarı geçerken proteolitik kesim ile uzaklaştırılan amino ucu sinyal dizileriyle gidecekleri yere hedeflenirler.

Proteoliz, sinyal dizi, sinyal peptidaz

Glikozilasyon: Birçok ökaryot protein, özellikle salgılanan ve zara eklenen proteinler, endoplazmik retikulum ve Golgi'de karbohidrat ilavesi ile modifiye olurlar.

glikozilasyon, glikoprotein, dolikol fosfat

Lipidlerin Takılması: Kovalent olarak bağlanan lipidler proteinleri genellikle plazma zarına yönlendirir ve yerleştirirler.

N-miristoillenme, prenillenme, palmitoillenme, glikolipid, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası

PROTEİN FONKSİYONUNUN DÜZENLENMESİ

Küçük Moleküllerle Düzenlenme: Birçok protein, amino asit ve nükleotid gibi bağlandığı zaman proteinin konformasyon ve aktivitesinde değişiklik oluşturan moleküllerle düzenlenir.

allosterik düzenlenme

Protein Fosforilasyonu: Birçok hücresel proteinin aktivitesini kontrol eden tersinir fosforilasyon protein kinazlar ve fosfatazlar tarafından sağlanır.

protein kinaz, protein-serin/treonin kinaz, protein-tirozin kinaz, protein fosfataz

ubikütin, proteazom

lizozom, otofaji

Protein-Protein Etkileşimleri: Polipeptid zincirleri arasındaki etkileşim allosterik enzimler ve diğer hücresel proteinlerin regülasyonu için önemlidir.

PROTEİN YIKIMI

Ubikütin–Proteazom Yolağı: Ökaryot hücrelerde seçili protein yıkımı için esas yol ubikütini işaret olarak kullanır ve proteinleri proteazomda hızlı bir şekilde yıkar.

Lizozomal Proteoliz: Lizozomal proteazlar hücre dışı proteinleri endositozla içeri alıp yıkarlar ve sitoplazmik organeller ile, uzun ömürlü sitozolik proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Otofaji hücre açlığına yanıt olarak aktive olur.

Sorular

1. E. coli mRNA'sında 64 farklı kodon bulundurur, bunların 61'i amino asit kodlar. Sadece 40 farklı tRNA sı olan bakteri proteinlerini nasıl sentezleyebilir?

2. Ribozom mRNA'yı hangi yönde okur ve polipeptid hangi yönde sentezlenir?

3. Klonlanmış bir cDNA'yı bakteride eksprese etmek istiyorsunuz. Bu diziye nasıl bir dizi ilave etmelisiniz ki, mRNA prokaryot ribozomunda okunabilsin?

4. Ribozomal RNA'nın ribozomda esas katalitik bileşen olduğunun kanıtlarını tartışınız.

5. Döllenmiş yumurtada poliadenilasyon inhibitörünün protein sentezine ne gibi etkisi olur?

6. Şaperonlar nedir?

7. Isı şoku proteinlerinin sentezinin uyarılmasını, hücrenin yüksek sıcakla karşılaşması nasıl sağlar?

8. Bitki oksini sodyum fenilasetatı incelerken, bunun farnezil grup sentezini inhibe ettiğini keşfediyorsunuz. Aldığınız genel hücre biyolojisi dersinden, bu bilginin anormal aktif Ras proteini içeren kanserler üzerindeki potansiyel riskini fark ediyorsunuz. Fenil asetatın Ras fonksiyonunu nasıl etkileyeceğini düşünüyorsunuz ve neden birtakım yan etkileri olacaktır?

9. Karaciğer hücresi yüzeyinde eksprese olan bir proteini çalışmakla ilgileniyorsunuz. Bu hücrelerin fosfolipaz ile muamelesi, bu proteinin bir transmembran protein mi yoksa hücre yüzeyine GPI aracılığı ile bağlanmış mı olduğunu tanımlamanızı nasıl sağlar?

10. Ubikütinlenme ve özgül proteinlerin proteazomda yıkımının protein üzerinde özgül hedef diziler gerektirdiğinin kanıtları nelerdir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

mRNA'nın Translasyonu

Arnez, J. G. and D. Moras. 1997. Structural, and functional considerations of the aminoacetviation reaction. *Trends Biochem. Sci.* 22: 211-216. [R]

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905-920. [P]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19:548-555.[P]

Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545- 556. [R]

Gray, N. K. and M. Wickens. 1998. Control of translation initiation in animals. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 399-458. [R]

Green, R. and H. F. Noller. 1997. Ribosomes and translation. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 679-716. [R]

Hellen, C. U. T. and P. Sarnow. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15:1539-1612. [R]

Illangeskare, M., G. Sanchez, T. Nickles and M. Yarus. 1995. Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 267:643-647. [P]

Kisselev, L. L. and R. H. Buckingham. 2000. Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25: 561-566. [R]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19-28. [R]

Kloc, M., N. R. Zearfoss and L. D. Etkin. 2002. Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108: 533-544. [R]

Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870. [R]

Moore, P. B. and T. A. Steitz. 2002. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418:229-235. [R]

Nissen, P, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920-930. [P]

Noller, H. R, V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256:1416-1419.[P]

Nomura, M. 1997. Reflections on the days of ribosome reconstitution research. *Trends Biochem. Sci.* 22:275-279. [R]

Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108: 557-572. [R]

Sachs, A. B., P. Sarnow and M. W. Hentze. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89: 831-838. [R]

Saks, M. E., J. R. Sampson and J. N. Abelson. 1994. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science* 263:191-197. [R]

Wilson, K. S. and H. F. Noller. 1998. Molecular movement inside the translational engine. *Cell* 92: 337-349. [R]

Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartrsch and V. Ramakrishnan. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* W7:327-339. [P]

Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. NH. Earnest, J. H. D. Cate and H. F. Noller. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution. *Science* 292:883-896. [P]

Zamore, P. D. 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296: 1265-1269. [R]

Protein Katlanması ve İşlenmesi

Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Bolsvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich and P. B. Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578-586. [P]

Dalbey, R. E. and G. von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* 17: 474-478. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Farazi, T. A., G. Waksman and J. I. Gordon.2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 276:39501-39504. [R]

Gahmberg, C. G. and M. Tolvanen. 1996. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 21: 308-311. [R]

Gething, M.-J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45. [R]

Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1858. [R]

Helenius, A. and A. Markus. 2001. intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291:2364-2369. [R]

Hirschberg, C. B. and M. D. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63-87. [R]

Kornfield, R. and S. Kornfield. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 631-664. [R]

Schiene, C. and G. Fischer. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10: 40-45. [R]

Sigler, P. B., Z. Xu, H. S. Rye, S. G. Burstan, W. A. Fenton and A. L. Horwich. 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 581-608. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563-591. [R]

Wells, L., K. Vosseller and G. W. Hart. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291: 2376-2378. [R]

Young, J. C., I. Moarefi and F. U. Hartl. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* 154:267-273. [R]

Zhang, F. L. and P. J. Casey. 1996. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65:241-269. [R]

Protein Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Barford, D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 407-412. [R]

Fauman, E. B. and M. A. Saper. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* 21: 413-417. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase β to α converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000:297-301. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236. [R]

Manning, G., G. D. Plovvman, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27: 514-520. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939-945. [P]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329. [P]

Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683. [R]

Taylor, S. S., D. R. Kmghton, J. Zheng, L. F. R. Eyck and J. M. Sowadski. 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:429-462. [R]

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294:1299-1304. [R]

Protein Yıkımı

Conaway, R. C., C. S. Brovver and J. W. Conaway. 2002. Emerging roles of ubiquitin in transcriptional regulation. *Science* 296: 1254-1258. [R]

Coux, O., K. Tanaka and A. L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 801-847. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138. [P]

Hershko, A. and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 425-479. [R]

Jackson, P, K. 2001. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* 15: 3053-3058. [R]

Jackson, P. K., A. C. Eldridge, E. Freed, L. Furstenthal, J. Y. Hsu, B. K. Kaiser and J. D. R. Reimann. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10:429-439. [R]

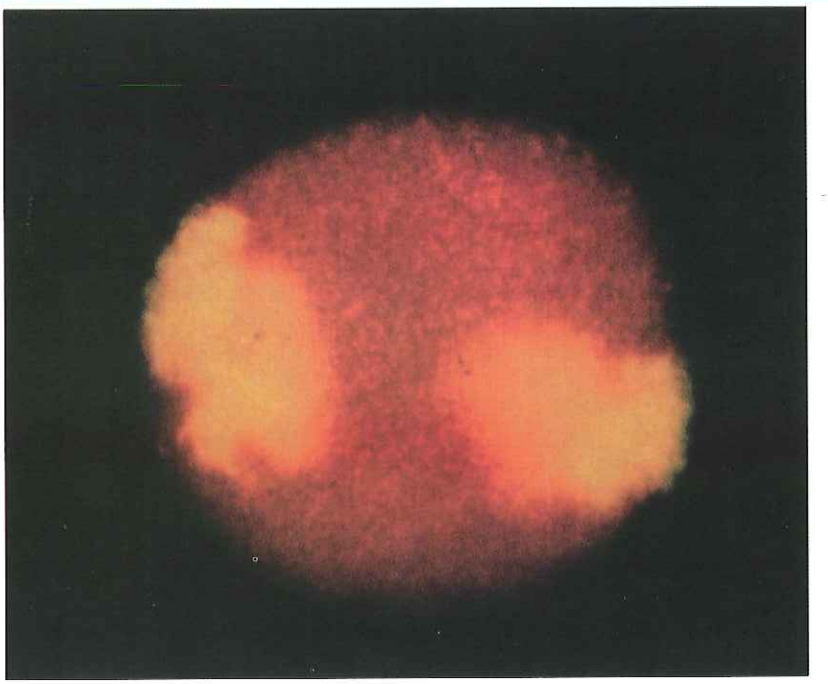
Klionsky, D. J. and S. D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721. [R]

Laney, J. D. and M. Hochstrasser. 1999. Substrate targcting in the ubiquitin system. *Cell.* 97:427-430. [R]

Pickart, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Ann. Rev. Biochem.* 70: 503-533. [R]

Kısım III

Hücre Yapısı ve İşlevi



8 Nükleus

9 Protein Sınıflanması ve Taşınması

10 Biyoenerjetik ve Metabolizma

11 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi

12 Hücre Yüzeyi

Bölüm 8

Nükleus

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik 323

Nükleusun İç Düzeni 335

Nükleolus 339

Mitoz Sürecinde Nükleus 345

ANAHTAR DENEY:
Nükleer Yerleşim Sinyallerinin Tanımlanması 330

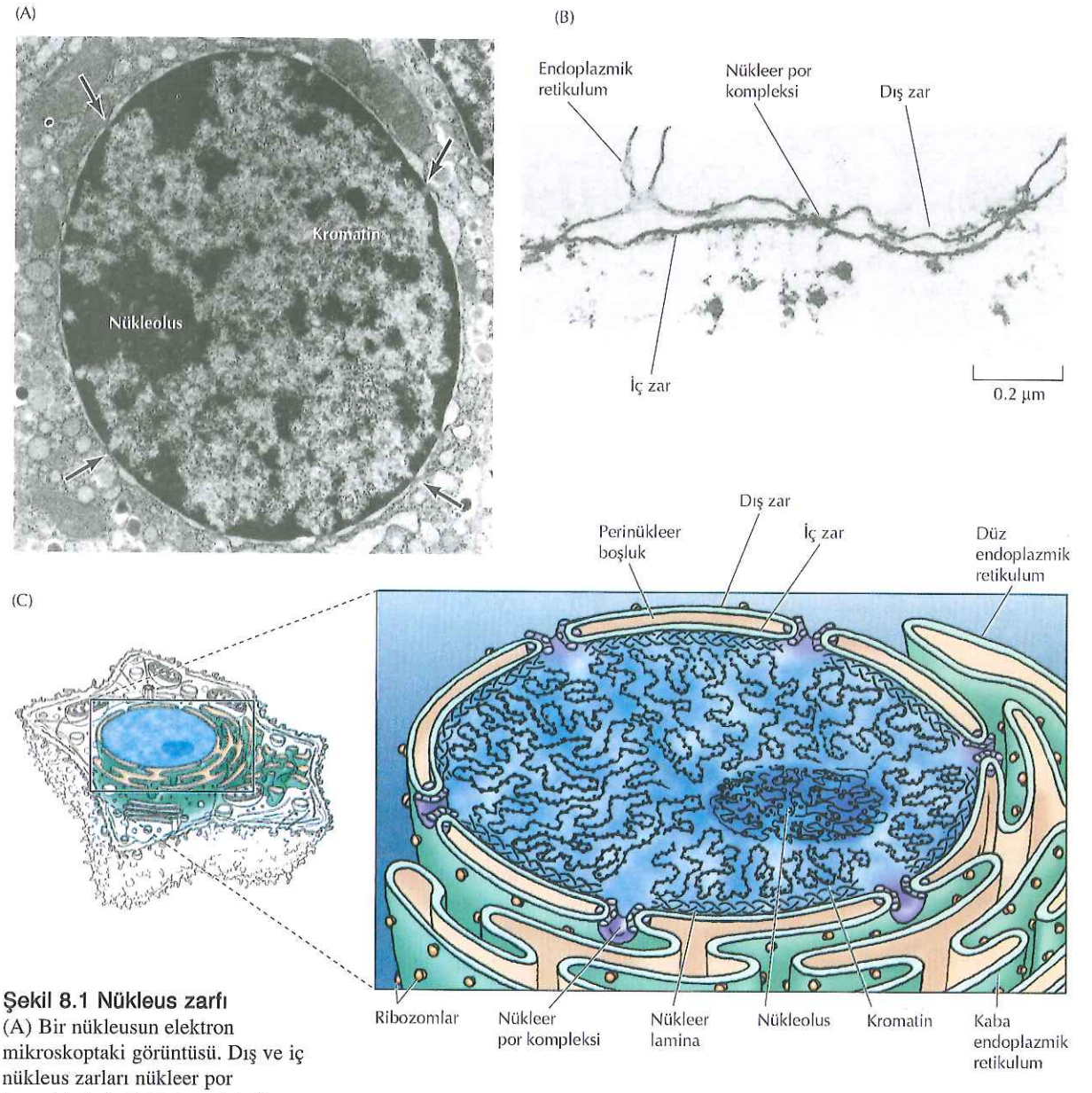
MOLEKÜLER TIP: Nükleer Lamina Hastalıkları 340

BİR NÜKLEUSUN VARLIĞI, ökaryot hücreleri prokaryotlardan ayırt eden temel özelliktir. Genomu bulundurmasıyla, hem genetik bilgiye ulaşım yeri ve hem de hücrenin kontrol merkezi işlevini üstlenir. DNA'nın replikasyonu, transkripsiyon ve RNA işlenmesi nükleusta gerçekleşir, sadece gen ekspresyonunun gerçekleşmesinin son aşaması (proteine çevrim) sitoplazmada yer almaktadır.

Nükleus zarfı genomu sitoplazmadan ayırarak, sadece ökaryotlarda görülen bir mekanizmayla gen ekspresyonun düzenlenmesini sağlar. Prokaryotlarda mRNA proteine çevrilirken transkripsiyonu da devam etmektedir, ökaryotlarda ise mRNA nükleustan sitoplazmaya aktarılmadan önce, transkripsiyon sonrası birçok işlemden geçmektedir. Nükleusun varlığı, gen ekspresyonunun alternatif kesip-ekleme gibi transkripsiyon sonrası mekanizmalarla düzenlenmesine olanak sağlar. Nükleus zarfı seçilmiş proteinlerin genetik materyale ulaşmalarını kısıtlayarak, gen ekspresyonunun transkripsiyon düzeyinde kontrolünde yeni bir olanak sağlamaktadır. Örneğin, bazı ökaryot genlerin ekspresyonları, ilgili transkripsiyon faktörlerinin sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasının düzenlenmesiyle kontrol edilir-prokaryotlarda bu şekilde transkripsiyon düzenlenmesi olanaksızdır. Genomun mRNA translasyon bölgesinden ayrılmasıyla, ökaryot gen ekspresyonunda merkezi bir rol gerçekleşir.

Nükleer Zarf ve Nükleus ile Sitoplazma Arasındaki Trafik

Nükleus zarfı, nükleus içeriğini sitoplazmadan ayırır ve çekirdeğe yapısal bir çerçeve oluşturur. İki zarın oluşturduğu zarf, moleküllerin nükleus ve sitoplazma arsında serbest geçişini engeller, nükleusun farklı biyokimyasal bir bölme olarak kalmasını sağlar. Nükleus zarfında sadece porların oluşturduğu kanallardan, nükleus ile sitoplazma arasında düzenlenmiş bir moleküler geçişe olanak tanınır.

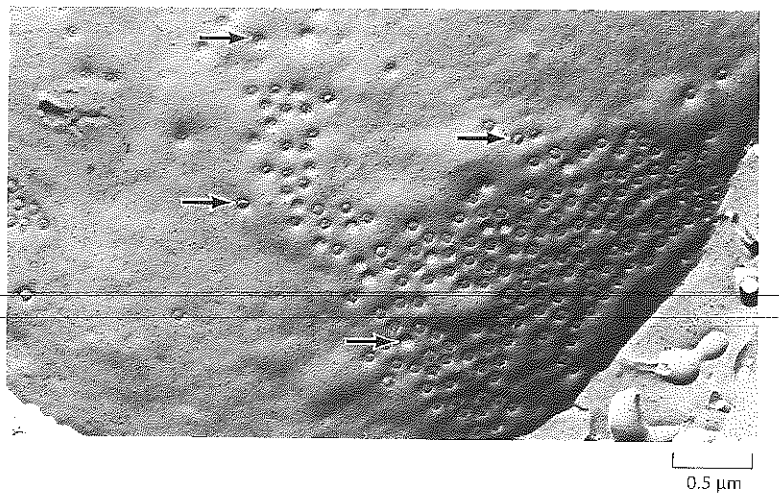


Şekil 8.1 Nükleus zarfı
(A) Bir nükleusun elektron mikroskoptaki görüntüsü. Dış ve iç nükleus zarları nükleer por komplekslerinde birleşmektedir (oklar). (B) Dış nükleus zarının endoplazmik retikulumla devam ettiğinin görüldüğü bir elektron mikroskop görüntüsü. (C) Nükleus zarfının şeması. İç çekirdek zarı, kromatinin bağlanma bölgelerini oluşturan nükleer lamina ile kaplıdır. (A, David M Phillips/Photo Researchers,Inc,; B, Dr.Werner W Franke'nin izniyle, German Cancer Reseach Center, Heidebeg.)

Protein ve RNA'ların nükleer por komplekslerinden seçilmiş taşınımı, sadece nükleusun iç yapısının oluşmasında değil, aynı zamanda ökaryotik gen ekspresyonunda da esastır.

Nükleer Zarfın Yapısı

Nükleus zarfı, iki nükleus zarı, altlarında yer alan bir nükleer lamina ve nükleer por komplekslerinden oluşan, karmaşık bir yapıdır (Şekil 8.1). Nükleus, biri iç diğeri de dış **nükleer zar** olarak adlandırılan, ortak merkezli iki zar sistemiyle kuşatılmaktadır. Dış nükleus zarı endoplazmik retikulum zarıyla devam eder, bu da nükleus iç ve dış zarları arasındaki alanın, endoplazmik retikulum lümeniyle doğrudan ilişkisini sağlamaktadır. Dış nükleus zarı işlevsel olarak endoplazmik

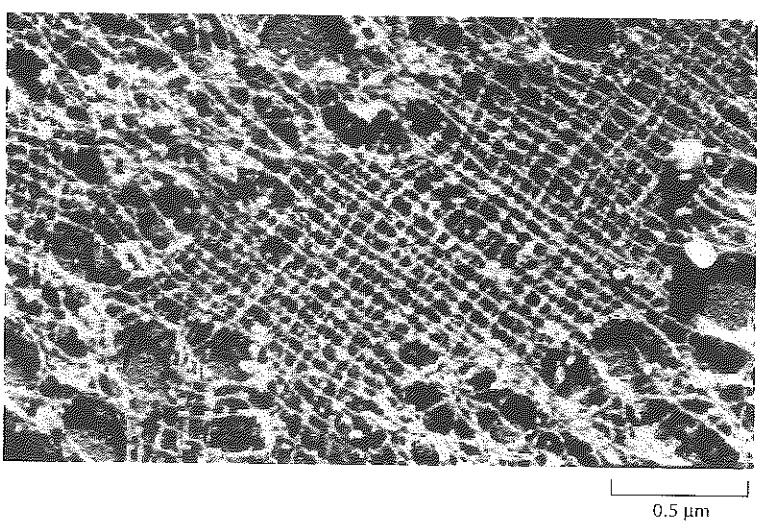


Şekil 8.2 Nükleer porları gösteren elektron mikroskop görüntüsü
Nükleus zarının dondurulup çatlatılmasıyla elde edilen kesitlerde çok sayıda nükleer por (oklar) görülebilmektedir. (Photo Reseachers Inc.)

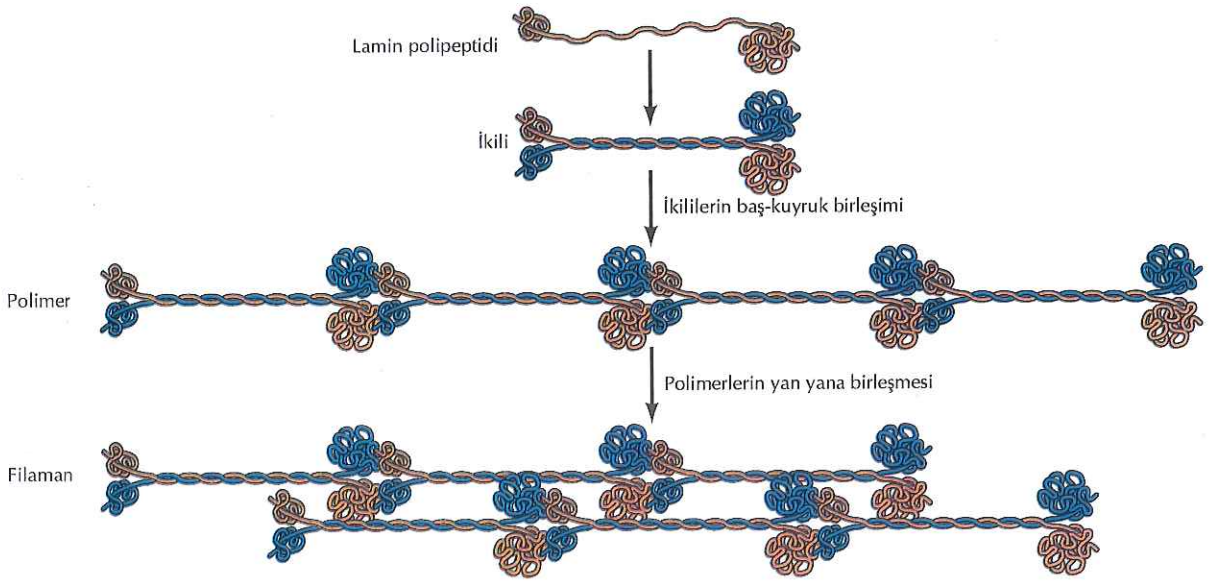
retikulum zarlarına benzemekte (bkz. Bölüm 9) ve dış sitoplazmik yüzeyine ribozomlar bağlanmaktadır. Bu yapıya zıt olarak, iç nükleus zarı çekirdeğe özel proteinler taşır, nükleer lamin matrisine bağlanan proteinler örneklerden biridir (aşağıda tartışılmaktadır).

Çekirdek zarlarının en önemli işlevlerinden biri, nükleusun içeriğinin sitoplazmadan ayrılmasını sağlamak üzere, arada engel oluşturmasıdır. Diğer hücresel zarlar gibi nükleus zarı da çift tabakalı fosfolipid yapısında olup, sadece polar olmayan küçük moleküller için geçirgendir (bkz. Şekil 2.50). Diğer moleküller çift tabakadan sızamazlar. İç ve dış çekirdek zarları por komplekslerinde birleşir ve küçük polar moleküller ile makro moleküllerin nükleus zarfını geçebildikleri yegane yerler bu por kompleksleridir (Şekil 8.2). Birazdan tartışılacağı gibi, nükleer por kompleksleri, proteinlerin ve RNA'ların nükleusla sitoplazma arasındaki geliş-gidişlerini seçici olarak kontrol eden karmaşık yapılardır.

İç zarın altını kaplayan **nükleer lamina,** nükleusa yapısal destek sağlayan, ipliksi bir örgüdür (Şekil 8.3). Nükleer lamina, **laminler** adı



Şekil 8.3 Nükleer laminanın elektron mikroskop görüntüsü
Nükleer lamina, ipliklerden oluşan eleksi yapısıyla çekirdek iç zarını alttan destekleyerek, nükleus içerisine yayılır. (U.Aebi, J.Cohn, L.Buhle and L.Gerace, 1986. *Nature* 323:560. dan alıntı).



Şekil 8.4 Lamin yapılanma modeli
İki polipeptid molekülünün, merkezi alfa heliks bölgelerinde, birbirine sarılmasıyla lamin dimerleri oluşur. Bundan sonraki yapı, dimerlerin baş kuyruk bağlantılarıyla doğrusal bir polimer oluşturmaları ve polimerlerin yan yana yerleşmesiyle ortaya çıkan filamanlardır.

verilen bir veya daha çok benzer proteinden oluşmaktadır. Örneğin memeli hücrelerinin çoğu, A, B1, B2 ve C olarak tanımlanan dört farklı lamin içerir. Bütün laminler 60-80 kilo dalton (kd) büyüklüğünde, hücre iskeleti ara- filaman proteinleriyle ilişkili, ipliksi proteinlerdir (bkz. Bölüm 11). Diğer ara filaman proteinleri gibi, laminler filamanları oluşturmak üzere birbirleriyle bağlanırlar (Şekil 8.4). Bu yapılanmanın ilk basamağı iki polipeptid zincirinin, α-heliks yapılı bölgelerinin, dolanmış sarmal denilen bir yapı oluşturmak üzere üst üste kıvrılması ile, lamin molekülünün bir dimer oluşturacak şekilde bağlanmasıdır. Daha sonra bu lamin dimerleri birbirleriyle bir araya gelerek filamanları ve bunlar da nükleer laminayı oluşturur. Laminlerin iç nükleus zarına tutunmaları, translasyon sonrası lipid eklenmesi- özellikle C ucu sisteinin prenillenmesi- ile kolaylaştırılır (bkz. Şekil 7.32). Buna ek olarak, laminler nükleusun iç zarındaki özgün proteinlerine bağlanır ve bu nükleus zarfına tutunmalarını, nükleus içerisinde yerleşim ve bağlantı düzenlemelerini sağlar.

Nükleer laminlerin çok daha gevşek yapılanmış olan matrisi, nükleusun iç kısımlarına doğru yayılır. Bu laminler kromatinin tutunma bölgelerini oluşturur. Kromatin, nükleus içinde geniş DNA ilmikleri şeklinde düzenlenmiş olup, özel ilmik bölgelerinden lamin matrisine tutunur. Normal lamin organizasyonu DNA replikasyonu için şarttır ve transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

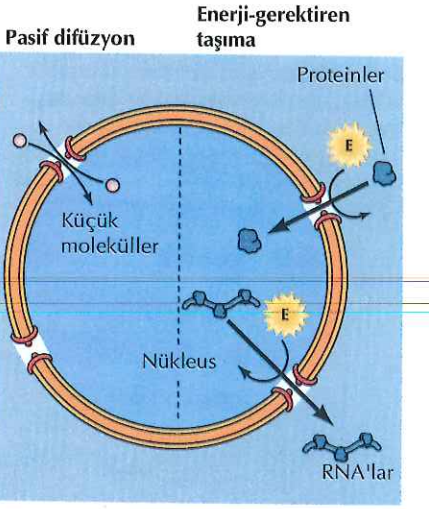
Nükleer Por Kompleksi

Nükleer por kompleksleri, küçük polar moleküllerin, iyonların ve makromolekülerin (proteinler ve RNA'lar) nükleus ile sitoplazma arasında taşınımlarının gerçekleştirildiği yegane kanallardır. Nükleer por kompleksi 120 nm çapında, ölçülen moleküler ağırlıkları 125 milyon dalton olup, –ribozom büyüklüğünün 30 katı kadar- oldukça geniş yapılardır. Omurgalılarda, nükleer por kompleksleri 50 ila 100 farklı proteinden oluşmakta ve yapıda çoğundan birçok kopya yer

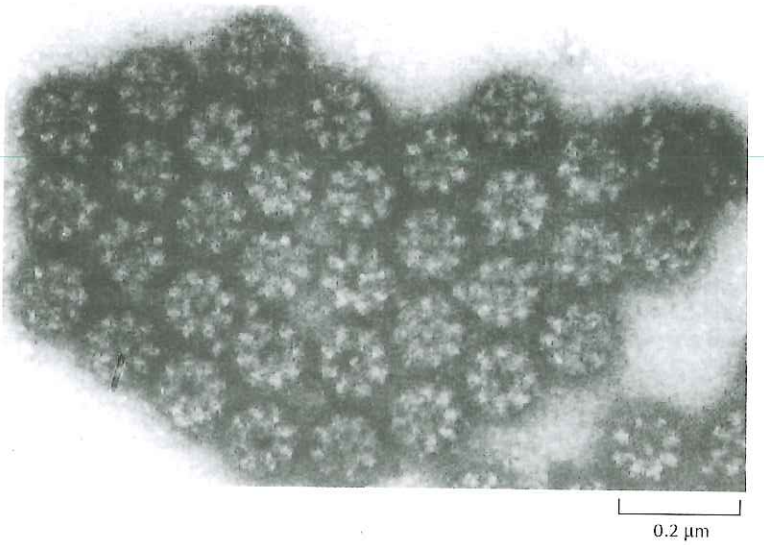
almaktadır. Nükleusla sitoplazma arasında moleküllerin taşınımlarını denetleyen, nükleer por kompleksleri, ökaryot hücrelerin fizyolojilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. RNA'ların, sentezlendikleri nükleustan protein sentezindeki işlevlerini gerçekleştirecekleri sitoplazmaya, hızlı ve verimli şekilde gönderilmesi gerekir. Bunun aksi yönünde, nükleus işlevleri için gereksinim duyulan proteinler (örn., transkripsiyon faktörleri) sitoplazmada sentez edildikleri yerden çekirdeğe taşınmalıdırlar.

Moleküller, büyüklüklerine bağlı olarak, nükleer por komplekslerinden iki farklı mekanizmayla geçerler (Şekil 8.5). Moleküler ağırlıkları 20 kd'nun altında olan bazı proteinler ve küçük moleküller, nükleus zarfını her iki yönde: sitoplazmadan çekirdeğe ya da çekirdekten sitoplazmaya doğru serbestçe geçerler. Yaklaşık 9 nm çapında olan moleküller, nükleer por komplekslerinde sulu kanallardan pasif difüzyonla geçerler. Ancak, birçok protein ve RNA açık kanallardan geçemez. Bunun yerine, belirli protein ve RNA molekülleri, özgül olarak tanınıp, seçici olarak uygun yönde (nükleustan sitoplazmaya ve sitoplazmadan nükleusa) taşındıkları bir aktif süreçle nükleer por kompleksini geçerler.

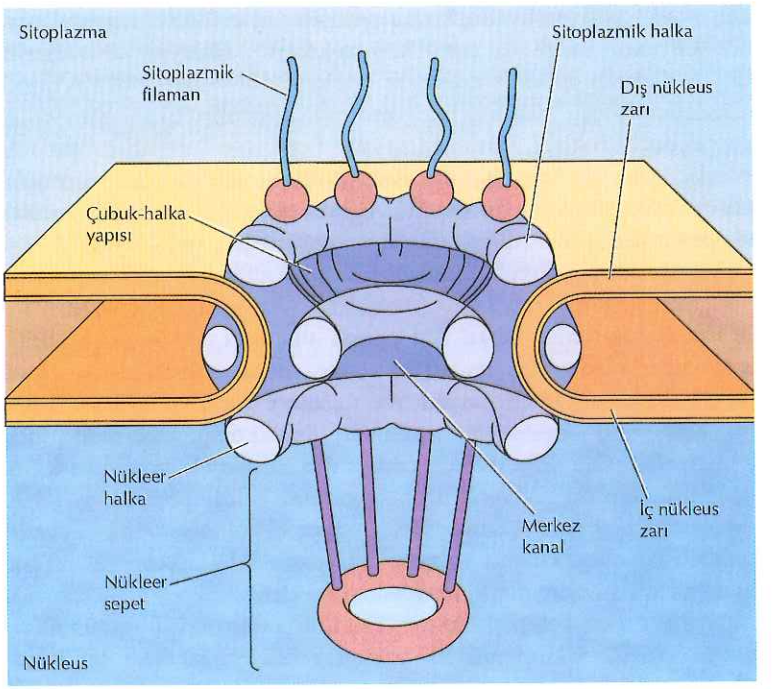
Nükleer por komplekslerinin elektron mikroskopik görüntüleri, protein ve RNA'ların nükleus zarfını geçtikleri merkezi bir kanal çevresinde, sekizli bir simetrik yapıyı ortaya koydu (Şekil 8.6). Bilgisayar destekli görüntü analizleri dahil, ileri düzeyde yapılan çalışmalar, nükleer por komplekslerinin üç boyutlu modellerinin oluşturulmasına katkı sağladı (Şekil 8.7). Bu çalışmalar, nükleer por komplekslerinin, merkezi bir kanal etrafında dizilmiş sekiz çubuğun birleşimiyle oluştuğunu gösterdi. Çubuklar nükleus ve sitoplazma yüzeyindeki halkalara tutunur ve bu çubuk-halka yapılanması, iç ve diş zarların birleşim yerlerinde nükleus zarfına yerleşir. Protein filamanlar sitoplazmik ve nükleer halkalar arasında uzanarak, nükleus yönünde sepete benzer bir yapı oluşturur. Makro moleküllerin geçişi sırasında, merkezi kanalın açıklığı 9 nm den 40 nm ye kadar değişir, bu şekilde en büyük parçacıkların dahi çekirdek zarfını geçmesine yetecek boyutlara ulaşılmaktadır.



Şekil 8.5 Nükleer por komplekslerinden moleküler taşınım
Küçük moleküller nükleer por komplekslerinden pasif difüzyonla kolayca geçerler. Bunun aksine, makromoleküller, özellikle proteinleri sitoplazmadan nükleusa ve RNA'ları nükleustan sitoplazmaya taşıyan, enerji bağımlı seçici bir taşınımla aktarılırlar.



Şekil 8.6 Nükleer por komplekslerinin elektron mikroskopik görüntüsü
Bu yüzeyden bakışta, izole nükleer por komplekslerinin, merkezi bir kanal etrafında simetrik yerleşimli sekiz yapısal alt birimli yapısı dikkat çekmektedir. (Dr Ron Milligan'ın izniyle, The Scripps Research Institute)



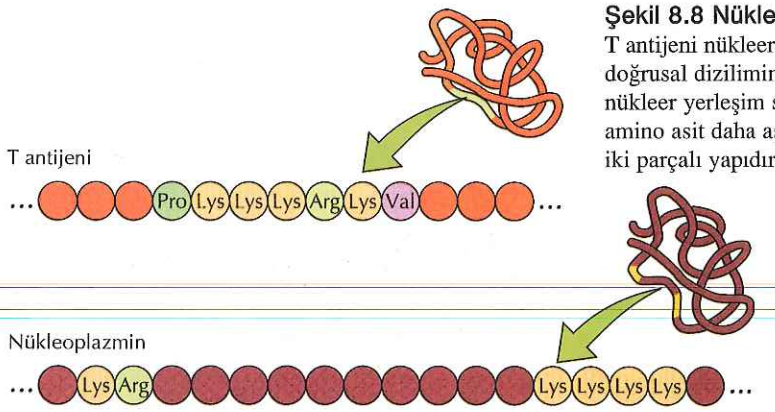
Şekil 8.7 Nükleer por kompleksi modeli
Kompleks, nükleus zarfının sitoplazma ve nükleus tarafındaki halkalara tutunmuş sekiz çubuktan oluşur. Çubuk-halka yapısı merkezdeki kanalı çevreler. Sitoplazmik filamanlar sitoplazmik halkadan, nükleer sepeti oluşturan filamanlar ise nükleer halkadan çıkar.

Proteinlerin Nükleusa ve Nükleusdan Seçili Taşınımı

Nükleus zarfından seçili taşınım, en iyi şekilde, sitoplazmadan nükleusa alınan proteinlerin geçişlerinde anlaşılmıştır. Bu çeşit proteinler genom yapısı ve işlevlerinin her yönünden sorumludur; bunlar, histonları, DNA polimerazları, RNA polimerazları, transkripsiyon faktörlerini, kesip-ekleme faktörlerini ve diğerlerini kapsamaktadır. Bu proteinler, taşıyıcı reseptörler tarafından tanınıp proteinin nükleer por kompleksinden geçmesini sağlayan, **nükleer yerleşim sinyalleri** olarak adlandırılan özgül amino asit dizileriyle çekirdeğe hedeflenirler.

Ayrıntılı haritası çıkartılan ilk nükleer yerleşim sinyali, Alan Smith ve arkadaşları tarafından 1984'de tanımlandı. Bu araştırıcılar, enfekte hücrede virus tarafından kodlanan ve viral DNA'nın replikasyonunu başlatan, Simian virus 40 (SV40) T antijenini incelediler (bkz. Bölüm 5). Bir replikasyon proteini olan T antijeni beklendiği gibi normal olarak nükleusta bulunur. Bu proteinin yapısında yer alan tek bir lizindeki mutasyonun çekirdeğe taşınmasını engellediğinin ve T antijeninin sitoplazmada biriktiğinin gözlenmesiyle, ilk kez nükleus yerleşiminden sorumlu sinyal saptandı. Ardından yapılan çalışmalar, T antijeni nükleer yerleşim sinyalinin, Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val den oluşan yedi amino asitlik yapısını belirledi. Bu dizinin sadece T antijeninin taşınmasında gerekli olmayıp, bağlandığı normal sitoplazmik molekülleri de çekirdeğe yönlendirdiği bulundu.

Daha sonra, diğer birçok proteinde de nükleer yerleşim sinyalleri tanımlandı. Bu dizilerden bazıları, T antijenindeki gibi, bazik amino asitlerce (lizin ve arjinin) zengin, kısa dizilerdir. Ancak, nükleer yerleşim sinyalini oluşturan amino asitler, genellikle, birbirlerine yakın olmakla birlikte, yan yana değildir. Örneğin, kromatin yapılanmasında görevli bir protein olan nükleoplazminin nükleer



Şekil 8.8 Nükleer yerleşim sinyalleri
T antijeni nükleer yerleşim sinyali, amino asitlerin tek doğrusal diziliminden oluşur. Bunun aksine, nükleoplazminin nükleer yerleşim sinyali, Lys-Arg dizini ve bunu izleyen, 10 amino asit daha aşağıda bulunan, Lys-Lys-Lys-Lys den oluşan iki parçalı yapıdır.

yerleşim sinyali iki parçadan oluşmaktadır; bir Lys-Arg çiftini takip eden ve bundan 10 amino asit aşağıda bulunan dört lizin (Şekil 8.8). Lys-Arg ve Lys-Lys-Lys-Lys yapılarının her ikisi de nükleusa hedeflenme için gereklidir, ancak bu iki yapı arasında yer alan on amino asitlik dizideki mutasyonlar, nükleusa yerleşimini etkilememektedir. Nükleer yerleşim sinyali iki ayrı elemandan oluşması nedeniyle, iki parçalı olarak da adlandırılır. Benzer iki parçalı motif, birçok nükleer proteininin yerleşim sinyali olarak işlev görür; bu nedenle, daha basit olan T antijeni nükleer yerleşim sinyalinden daha geneldir. Birçok nükleer yerleşim sinyali, sıklıkla temel ya da "klasik" nükleer yerleşim sinyali olarak bilinen, bu bazik amino asitleri içerirken, diğer nükleer yerleşim sinyallerini amino asit dizileri ve yapıları oldukça farklıdır.

Nükleer por kompleksinden protein alımında iki tip protein çok önemli rol oynar: bir nükleer taşınım reseptörü ve **Ran** denilen ve Ras proteinlerine benzeyen küçük GTP-bağlayan protein. İki tip nükleer taşınım reseptörü (**karyoferinler**) vardır: makromolekülleri sitoplazmadan nükleusa taşıyan **importinler** ve makromolekülleri nükleusdan sitoplazmaya taşıyan **eksportinler** (Tablo 8.1). Bazı importinler (Kapβ1) adaptör karyoferinle (Kapα) heterodimer halinde,

TABLO 8.1 Sübstratları Bilinen Karyoferinler

Karyoferin	Organizma	Sübstratlar
İçeri Alım		
Kapα / Kapβ1 ikilisi	İnsan	Bazik amino asitli nükleer yerleşim sinyal proteinleri (ör.,nükleoplazmin)
snurportin	İnsan	snRNP'ler (U1,U2,U4,U5)
Yalnız Kapβ1	İnsan	Cdk/siklin kompleksleri
Kapβ2 (transportin)	İnsan	mRNA bağlayıcı proteinler
Kapβ3	İnsan	Ribozomal proteinler
İmportin 7/Kapβ1 ikilisi	İnsan	HistonH1
Dışarı Verme		
Crm1	Omurgalılar	Lösince zengin nükleer çıkış sinyali içeren proteinler
CAS	İnsan	Kapα
Eksportin-t	İnsan	tRNA'lar
Eksportin 4	Fare	Uzama faktörü 5A

ANAHTAR DENEY

Nükleer Yerleşim Sinyallerinin Tanımlanması

A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location

Daniel Kalderon, Bruce L Roberts,William D.Richardson and Alan E. Smith

National Institute for Medical Research, Mill Hill, London

Cell, Volume 39, 1984, pages 499-509

Alan Smith

Bağlam

Nükleusun, farklı biyokimyasal yapıda bir bölme durumunu koruması, proteinleri sitoplazma ile çekirdek arasında dağıtan bir mekanizma gerektirir. 1970'lerde yapılan çalışmalar, küçük moleküllerin nükleus zarfını difüzyonla kolaylıkla geçtiğini, ancak proteinlerin bunu yapamadığını gösterdi. Bu durum, nükleer proteinlerin, sitoplazmik ribozomlar üzerinde sentezlendikleri yerden nükleusa, özel olarak tanınıp seçilerek taşınmaları olasılığını desteklemektedir.

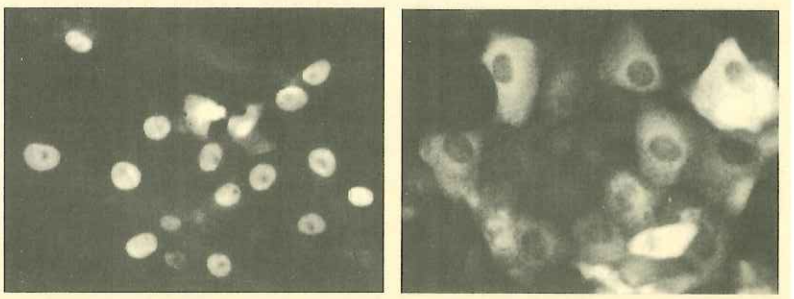
Günter Blobel ve arkadaşlarının daha önceki çalışmaları, proteinlerin endoplazmik retikuluma, kısa amino asit dizisinden oluşan sinyal dizileriyle hedeflendiklerini ortaya çıkartmıştı (bkz. Bölüm 9). Alan Smith ve arkadaşları 1984'deki bu yayınlarında, bu kuralı, nükleer proteinlerin nükleer yerleşim sinyali olarak iş gören kısa bir amino asit dizisini tanımlayarak geliştirdiler.

Deneyler

Bir viral protein olan SV40 T antijeni, hayvan hücrelerinde nükleer yerleşimi çalışmak için model olarak kullanıldı.T antijeni, 94-kd luk bir protein olup, SV40 DNA'sının replikasyonu için gereklidir ve normal olarak SV40 ile enfekte hücrelerde nükleusta bulunur. Alan Smith'in laboratuvarında ve Janet Butel'in laboratuvarında (Lanford and Butel, 1984, *Cell* 37:801-813) önceki çalışmalar, Ly-128'de Thr veya Asn değişimine yol açan mutasyonun, maymun ve kemirgen hücrelerinde T antijeninin, normal nükleer birikimini engellediğini göstermişti. Bu mutant T antijeninin, nükleusa taşınmak yerine sitoplazmada kalması, Lys-128'in nükleer yerleşim sinyalinin bir parçası olduğunu gösterdi. Kalderon ve arkadaşları, bu hipotezi iki farklı deney sisteminde test ettiler.

İlk olarak, farklı delesyonların T antijenin hücre içi bölümlerde yerleşimini nasıl etkilediğini araştırdılar. Bir ila 126'ncı ya da 136 ila C ucu arasında yer alan amino asitleri uzaklaştıran delesyonlara sahip T antijen mutantlarının, normal şekilde nükleusta biriktikleri bulundu. Bunun aksine, 127 ila 132 arasında amino asit delesyonu içeren mutant sitoplazmada kaldı.Böylece, 127 ile 132 arasında yer alan amino asit dizisinin, T antijenin nükleer yerleşimini belirlediği görülmüş oldu.

(A) (B)



Hücreler, SV40 amino asitlerinin piruvat kinaz ile birleştiği kimerik proteinleri kodlayan plazmid DNA'ları ile mikroenjekte edildi. Daha sonra, bu bileşik proteinlerin hücredeki yerleşimleri immün floresan mikroskopi ile belirlendi.(A) Bileşik protein SV40 nükleer yerleşim sinyaline (126 dan 132 ye amino asitleri) sahip.(B)Nükleer yerleşim sinyali, 131 ve132. amino asitlerin delesyonu ile inaktive edildi.

bazik nükleer yerleşim sinyali taşıyan proteinlerin içeri alınmasında işlev görür.

Protein alımı sırasında, özgül importin kargo proteindeki nükleus yerleşim sinyalini tanır. Ran ile etkileşimi bunu gerçekleştirmesini kolaylaştırır. Ran'ın konformasyonu ve aktivitesi, Ras (bkz. Şekil

Bu amino asit dizisinin, diğer proteinleri de nükleusa yönlendirip yönlendirmeyeceğini belirlemek için, araştırmacılar normalde sitoplazmada bulunan proteinlere T antijeni amino asit dizisini yerleştirdiler. Bu deneyler, β galaktozidaz veya piruvat kinaz proteinlerine, T antijeninin 126 dan 132 ye kadar olan amino asitlerinin eklenmesinin, normalde sitoplazmik olan bu moleküllerin nükleusta birikmesi için yeterli olduğunu gösterdi (şekle bakınız). SV40 T antijeni kısa amino asit dizisi, proteinlerin nükleus içerisine alınması için hem gerekli hem de yeterli olan, nükleer yerleşim sinyali olarak işlev görmektedir.

Etki

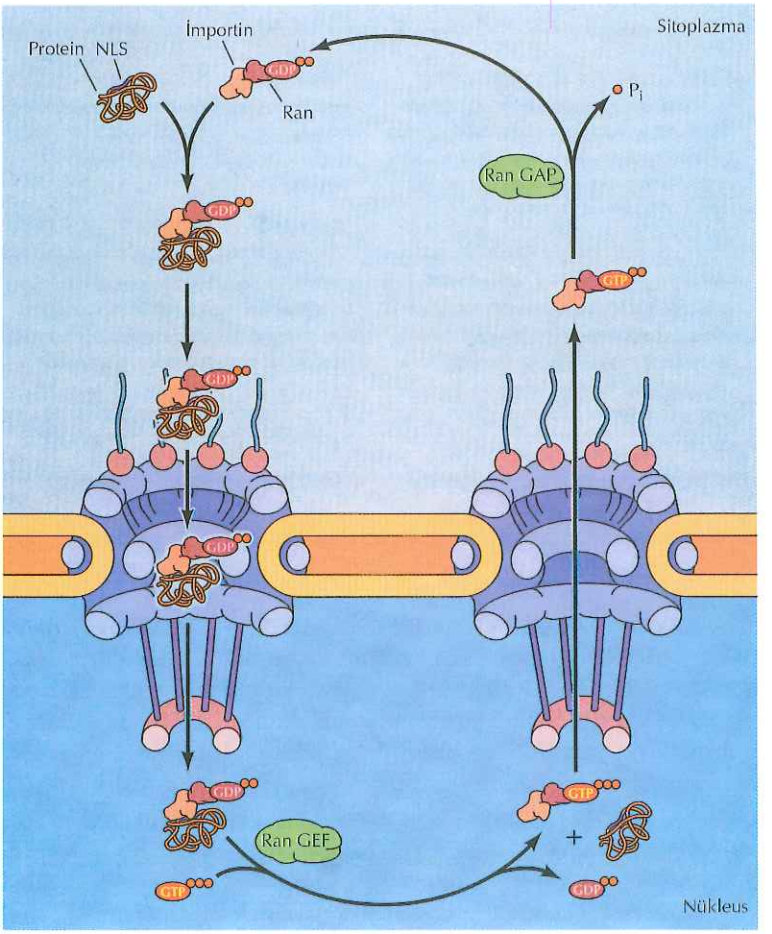
Kalderon ve arkadaşlarının 1984'deki yayınlarında ileri sürdükleri, SV40 T antijeninin nükleus yerleşim sinyalinin "diğer nükleus proteinlerindeki benzer diziler için prototip olduğu" kavramı doğrulandı. Proteinleri nükleusa alınmalarını yönlendiren bu sinyaller, nükleusun biyokimyasal kimliğinin belirlenmesinde ve sürdürülmesinde ve ökaryotlarda sitoplazma ve nükleus bölmelerinin oluşmasında anahtar rol oynamaktadırlar. Nükleus yerleşim sinyallerinin, sitoplazmik reseptörler tarafından tanındığı ve kendi sübstrat proteinlerinin nükleer por komplekslerine yönlendirilmelerinde rol oynadığı yeni bulgular arasında yer aldı. Nükleus yerleşim sinyallerinin saptanması proteinlerin nükleusa alınma mekanizmalarını anlamada önemli gelişme sağladı.

7.36) veya protein çevriminde yer alan bazı çeviri faktörlerinde (bkz. Şekil 7.13) olduğu gibi, GTP bağlanması ve hidroliziyle düzenlenir. Ran'da GDP'nin GTP ile değişimini gerçekleştiren enzimler, nükleer zarfın nükleer yönünde yerleşmelerine karşın, GTP'nin GDP'ye hidrolizini uyaranlar sitoplazmik yönde yerleşmişlerdir. Yüksek konsantrasyonda Ran/GDP'nin sitoplazma tarafında ve Ran/GTP'nin nükleus tarafında yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle, nükleer geçidin iki yanında Ran/GTP gradienti oluşur. Bu Ran/GTP gradientinin, nükleer taşınımın yönünü belirlediği düşünülmektedir.

Proteinlerin çekirdek por komplekslerinden içeri alınması, beş aşamalı bir döngüyle gerçekleşir (Şekil 8.9). İlk basamakta importin-Ran/GDP kompleksi, nükleer yerleşim sinyali bulunduran kargo proteine bağlanır. İkinci basamakta, bu kargo-reseptör kompleksi nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamanlarına bağlanır. Taşınım, taşınacak proteinin, nükleer por proteinlerinin birinden diğerine nükleusa doğru gittikçe yaklaşarak aktarılmasıyla gerçekleşir.

Protein alınım döngüsünün üçüncü basamağı, Ran'a bağlı GDP'nin nükleus içerisinde GTP ile değişmesi aşamasıdır. Bu değişim importinin yapısında değişikliğe yol açarak, taşınan protein kargonun nükleus içerisine serbest kalmasını sağlar. Dördüncü basamakta importin-Ran / GTP kompleksi, nükleer por kompleksi içerisinden geri gönderilir. Yeni bir taşınımda kullanılabilecek Ran / GDP'yi oluşturmak üzere GTP'nin GDP'ye hidrolize olduğu son basamak sitoplazmada gerçekleşir.

Bazı proteinler çekirdeğe alındıktan sonra orada kalırlarken, diğer bir çok protein çekirdekle sitoplazma arasında gidip gelirler. Bunlardan bazıları RNA'lar gibi moleküllerin taşınımında rol alırken, diğerleri nükleer ve sitoplazmik işlevleri düzenlerler (örn., transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerinin düzenlenmesi). Proteinlerin çekirdekten dışarı gönderilmesi, **nükleer çıkış sinyali** adı verilen özgül amino asit dizileriyle sağlanır. Nükleer yerleşim sinyallerinde olduğu gibi, proteinlerin çekirdek por komplekslerinden sitoplazmaya doğru çıkışlarını eksportinler sağlar. Birçok eksportin, aynı zamanda karyoferin protein ailesinin de üyesidir (bkz. Tablo 8.1). İmportinlerde olduğu gibi eksportinler de, hem giriş hem de çıkışta rol



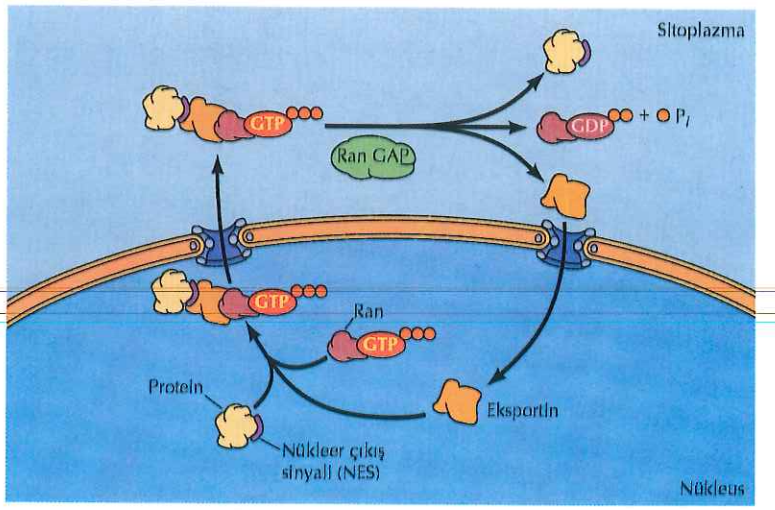
Şekil 8.9 Proteinlerin nükleer por kompleksinden içeri alınması
Proteinler, nükleer por komplekslerinden beş aşamalı bir döngüyle taşınırlar. İlk aşamada, nükleer yerleşim sinyali (NLS) içeren protein, küçük GTP bağlayan protein Ran ile kompleks yapmış importin tarafından tanınır. İkinci aşamada, kargo (nükleer yerleşim sinyali içeren protein)-importin-Ran/GTP kompleksi, nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamanlarına özgül olarak bağlanır. Üçüncü aşamada, bu kompleks por proteinlerine ardışık olarak bağlanarak nükleer por boyunca ilerler. Dördüncü aşamada, guanin nükleotid değişim faktörünün (Ran GEF) aktivitesiyle çekirdekteki Ran'a bağlı GDP, GTP'ye dönüşürken kompleksin yapısal şekli değişir ve taşınan protein serbest kalır. Beşinci aşamada, importin Ran/GTP kompleksi çekirdek porundan yeniden dışarı çıkar ve sitoplazmadaki GTPaz aktive edici protein (Ran GAP) GTP'yi GDP'ye hidrolizler.

oynayan Ran'a bağlanır (Şekil 8.10). Ancak, Ran / GTP, importinle kargosunun oluşturdukları kompleksi ayrıştırmasına karşın, eksportinle kargo arasında kararlı kompleks oluşmasında rol oynar. Eksportinlere Ran /GTP bağlanması nükleustan çıkış sinyali içeren proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınıma komutunu verir. Böylece, eksportinler taşınacak proteinlerle ve Ran / GTP katılımıyla, nükleus içerisinde kararlı kompleksler oluştururlar. Çekirdek zarfının sitoplazmik tarafına geçildiğinde, GTP hidrolizi taşınan proteinin sitoplazmada serbest kalmasına yol açar.

Nükleusa Protein Alımının Düzenlenmesi

Proteinlerin nükleus içerisine aktarılmasının ilginç bir yönü de, nükleer proteinlerin aktivite kontrolünün sağlandığı farklı bir aşama oluşturmasıdır. Örneğin transkripsiyon faktörleri, sadece nükleus içerisinde aktiftir, çekirdeğe alınmaları veya çekirdekten çıkartılmaları gen ekspresyonunun kontrolünde farklı bir yol sağlar. Bölüm 13'de tartışılacağı gibi, transkripsiyon faktörleri ve protein kinazların nükleusa girişlerinin kontrolü, hücrenin çevre koşullarındaki değişikliklere yanıt olan davranışlarının denetiminde önemli role sahiptir, çünkü hücre yüzeyinde alınan sinyallerin nükleusa iletilmesine yol oluşturur.

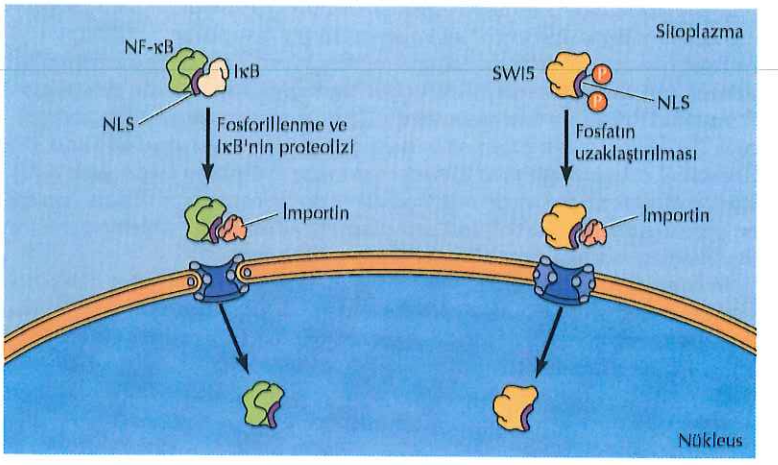
Bir düzenleme mekanizmasında, transkripsiyon faktörleri (veya diğer proteinler) nükleer taşınım sinyallerini maskeleyen sitoplazmik



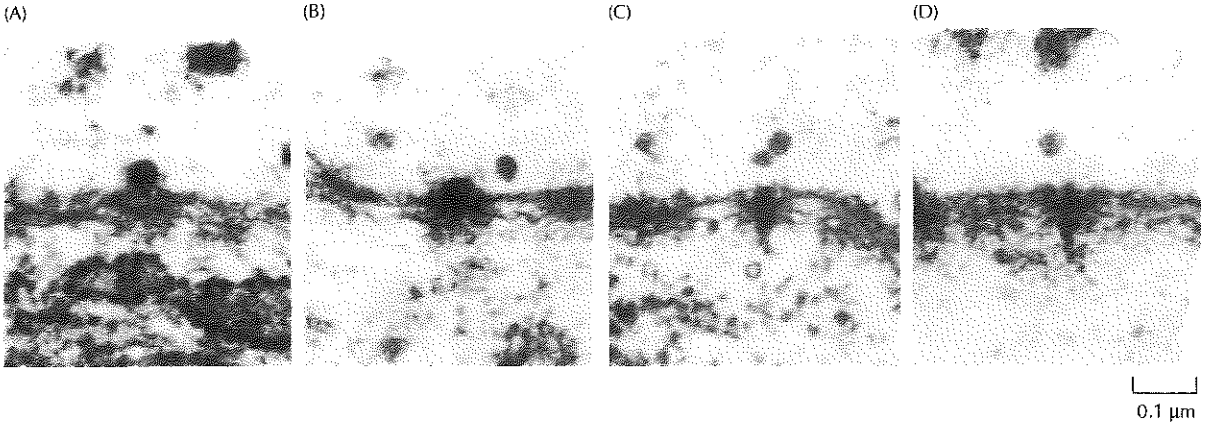
Şekil 8.10 Nükleustan çıkış
Nükleer çıkış sinyali (NES) içeren kargo proteinleri ile eksportinler ve Ran/GTP arasındaki kompleksler nükleusta oluşur. Nükleer por komplekslerinden taşınımı takiben, Ran GAP Ran/GDP oluşturmak üzere, bağlı GTP'nin hidrolizini uyarır ve ekportinle taşınan protein sitoplazmaya serbest bırakılır. Daha sonra eksportin çekirdeğe geri taşınır.

proteinlerle birleşirler; sinyaller algılanamaz hale geldiğinden sitoplazmada kalırlar. B lenfositlerde immünglobulin-κ hafif zincirinin transkripsiyonunu aktive eden transkripsiyon faktörü NF-κB bu duruma iyi bir örnektir (Şekil 8.11). Uyarılmamış hücrelerde NF-κB, inhibitör proteinle (IκB) aktif olmayan kompleks oluşturur ve sitoplazmada bulunur. IκB ile bağlanma NF-κB'nin nükleer yerleşim sinyalini maskeler ve NF-κB çekirdeğe taşınamaz. Uyarılan hücrelerde, IκB fosforillenir ve ubikütin-aracılı proteolizle yıkılır, NFκB çekirdeğe girerek hedef genlerde transkripsiyonu aktive eder.

Diğer bazı transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girişleri, inhibitör protein bağlanmasıyla değil, direkt olarak fosforilasyonla denetlenir. Örneğin, maya transkripsiyon faktörü SW15 sadece hücre yaşam döngüsünün belli bir basmağında nükleusa alınır (bkz. Şekil 8.11). Onun dışında, nükleer yerleşim sinyaline bitişik serinin fosfatlanmasıyla nükleusa taşınması engellenir ve sitoplazmada kalır.



Şekil 8.11 Transkripsiyon faktörlerinin nükleusa girişlerinin düzenlenmesi
Transkripsiyon faktörü NF-κB, nükleer yerleşim sinyalini (NLS) maskeleyen IκB ile inaktif kompleks oluşturarak sitoplazmada kalır. Hücre dışından uygun sinyal alındığında, IκB fosforillenir ve proteolizle yıkılır, böylece, NFκB nükleusa taşınabilir. Bunun aksine, maya transkripsiyon faktörü SW15, nükleer yerleşim sinyalinin yakınından fosforillenerek sitoplazmada kalır. Fosfatın kontrollu uzaklaştırılması ile NLS açığa çıkar ve hücre yaşam döngüsünün uygun aşamasında SW15 nükleusa taşınır.



Şekil 8.12 Bir ribonükleoprotein kompleksinin taşınımı
Böceklerin tükrük bezi hücreleri büyük ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri oluştururlar, 35 ila 40kb RNA içerirler ve toplam ağırlıkları 30 milyon dalton kadardır. Bu elektron mikroskop görüntüleri; böyle bir RNP'nin nükleer por kompleksine tutunmasını (A) ve sitoplazmaya aktarılırken RNA'nın çözüldüğünü göstermektedir (B-D). (H. Mehlin et.al., 1992. *Cell* 69: 605'den)

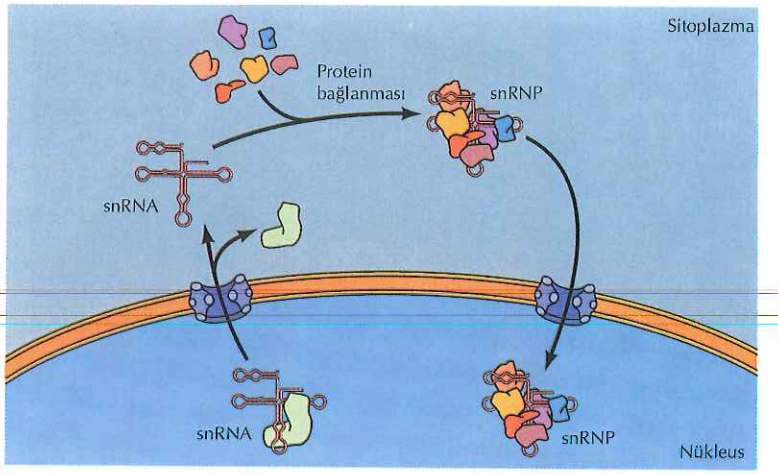
Hücre yaşam döngüsünün uygun evresinde, SW15'in kontrollü fosforilasyonu nükleusa aktarımını sağlar.

RNA'ların Taşınımı

Birçok proteinin sitoplazmadan çekirdeğe seçilerek taşınmasına karşın, çoğu RNA da nükleustan sitoplazmaya taşınır. Proteinler sitoplazmada sentezlendiğinden, mRNA'ların, rRNA'ların ve tRNA'ların nükleustan çıkışı ökaryot hücrelerde gen ekspresyonunda kritik bir basamaktır. Proteinlerin içeri alınmasında olduğu gibi, RNA'ların nükleer por komplekslerinden dışarı gönderilmesi, aktif ve GTP bağlayan protein Ran'a gereksinen enerji bağımlı bir işlemdir.

RNA'lar nükleus zarfından ribonüleoprotein (RNP) kompleksleri olarak taşınırlar (Şekil 8.12). Komplekstеki bazı proteinler nükleer taşıma reseptörleri tarafından tanınan nükleer çıkış sinyali taşırlar (bkz. Şekil 8.10). Pre-mRNA'lar ve mRNA'lar çekirdekte işlenmeleri süresince ve sonunda sitoplazmaya taşınmaları sırasında, en az 20 proteinlik bir setle (pre-mRNA-protein kompleksi oluşturarak) ilişkilenirler (bkz. Bölüm 6). En az iki mRNP proteini nükleer çıkış sinyaline sahiptir ve mRNA'ların sitoplazmaya taşınmasında işlev gördükleri düşünülmektedir. Ribozomal RNA'lar önce ribozomal proteinlerle ve RNA işleyen proteinlerle birleşirler, yeni oluşan 60S ve 40S ribozomal alt birimler sitoplazmaya taşınır (bkz. Şekil 8.28). Nükleustan çıkışları, alt birim komplekslerinde yer alan proteinlerin nükleustan çıkış sinyalleriyle yönlendirilir. tRNA'ların nükleustan çıkışını sağlayan özgül bir protein henüz tanımlanmamıştır.

Sitoplazmada işlevsel olan mRNA, rRNA ve tRNA'lardan farklı olarak, birçok küçük RNA (snRNA'lar ve snoRNA'lar) RNA işleme mekanizmasının bileşeni olarak çekirdekte görev yaparlar. İlginç olan, snRNA'ların önce nükleustan sitoplazmaya taşınarak, burada proteinlerle birleşip işlevsel snRNP'ler oluşturduktan sonra nükleusa geri dönmeleridir (Şekil 8.13). snRNA'ların 5'başlıklarına bağlanan taşıyıcı reseptör proteinlerin, snRNA'ların sitoplazmaya taşınmasında



Şekil 8.13 snRNA'ların nükleus ve sitoplazma arasında taşınımları
Küçük nükleer RNA'lar önce, nükleustan sitoplazmaya taşınır ve burada proteinlerle birleşerek snRNP'leri oluştururlar. Yapılanan snRNP'ler nükleusa geri taşınırlar.

görev aldıkları düşünülmektedir. Buna karşın, snRNP proteinlerinde bulunan diziler snRNP'lerin sitoplazmadan çekirdeğe taşınımından sorumludur.

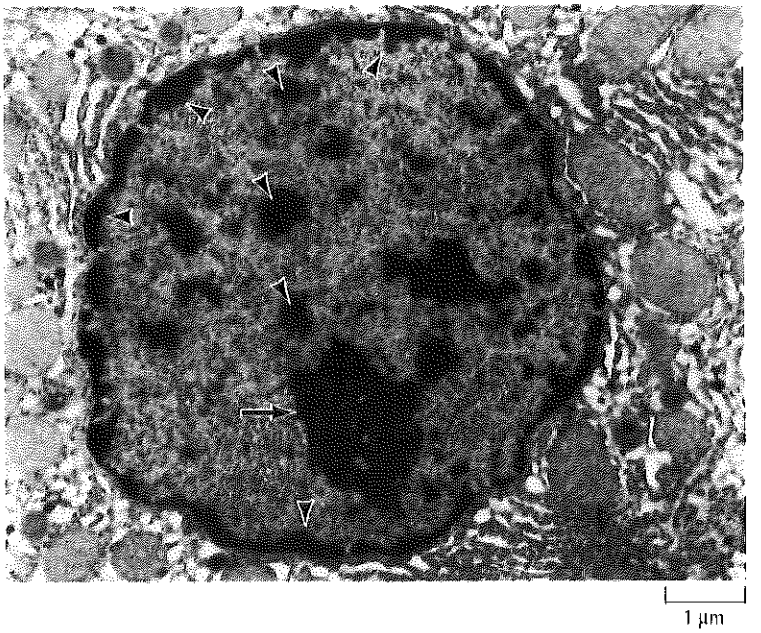
Nükleusun İç Düzeni

Nükleus, kromatinin, RNA'ların ve çekirdek proteinlerinin serbestçe içinde hareket ettikleri sıvı çözelti içeren bir kap değildir. Aksine, nükleus, genetik materyali düzenleyen ve nükleer işlevleri, özel belli bölgelere yerleştiren bir iç yapıya sahiptir. Bu büyük ölçüde, kromatinin nükleus içerisindeki çok iyi düzenlenmiş yapısına ve yerleşimine dayanmaktadır.

Kromozomlar ve Kromatin İnce Yapısı

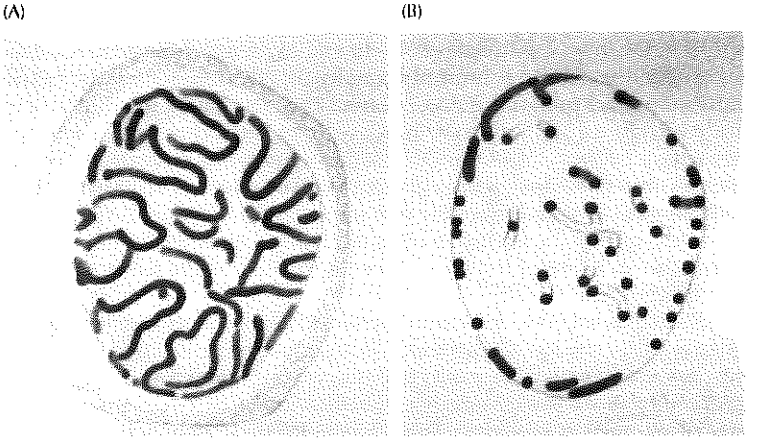
Kromatin, yavru nükleuslara dağıtılacak olan sıkıca paketlenmiş metafaz kromozomlarını oluşturmak üzere, mitoz sırasına yüksek düzeyde yoğunlaşır (bkz. Şekil 4.15). İnterfaz sırasında, kromatinin bir kısmı (**heterokromatin**) yoğunluğunu korur ve transkripsiyon yönünden inaktiftir; geri kalan kromatin bölgeleri (**ökromatin**) gevşektir ve çekirdek içerisinde her yöne yayılmış durumdadır (Şekil 8.14). Hücreler iki tip heterokromatin içerir. Bünyesel heterokromatin, sentromerlerde bulunan satellit dizilerde olduğu gibi, hiç bir zaman RNA'ya kopyalanmayan DNA dizileri içerir. Seçenekli heterokromatin ise, bir hücrede kopyalanmazken, diğerinde RNA'ya kopyalanan diziler içerir. Seçenekli heterokromatin miktarı hücrelerin transkripsiyonel aktivitelerine bağlı olarak değişir.

İnterfaz kromatini homojen bir şekilde dağılmış görülmesine karşın, kromozomlar belirli bir düzene göre yerleşirler ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan, iyi organize olmuş ayrı işlevsel bölgelere ayrılırlar. Çekirdek içersinde kromatinin gelişi güzel dağılmadığı ilk kez, 1885'de C.Rabl tarafından ileri sürüldü. Araştırıcı,

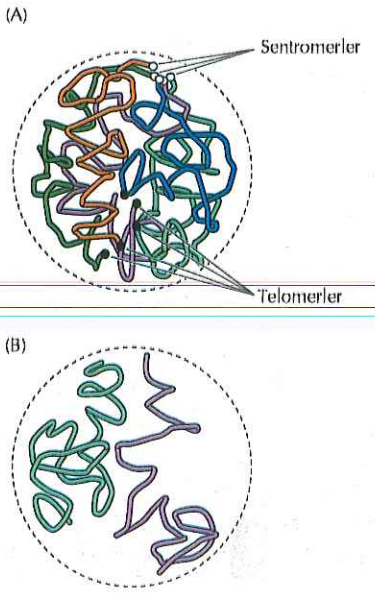


Şekil 8.14 İnterfaz nükleusunda heterokromatin
Ökromatin çekirdek içersinde dağılmıştır.Heterokromatin ok ucuyla ve nükleolus okla işaretlemiştir. (Ada L.Olins ve Donald E Olins'in katkıları, Oak Ridge National Laboratory)

her bir kromozomun, nükleer zarfta zıt bölgelere tutunan sentromer ve telomerleriyle, kendilerine ait bir yer işgal ettiklerini ileri sürdü (Şekil 8.15). Kromozom organizasyonunda temel model, *Drosophila* tükürük bezlerindeki politen kromozomların ayrıntılı çalışılmasıyla, yaklaşık yüz yıl sonra (1984'de) doğulandı. Kromozomların, birbirlerinin üzerine gelişigüzel dolanmadıkları, her bir kromozomun nükleusun farklı bir bölgesinde yerleştiği bulundu (Şekil 8.16). Kromozomlar birçok bölgede nükleus zarfıyla yakın ilişki içerisindedir.



Şekil 8.15 Kromozom organizasyonu
Selemender hücrelerinde kromozomların el çizimi taslağı. (A) Bütün kromozomlar, (B) Sadece telomerler (nükleus zarında yerleşimleri). (C. Rabl,1885. *Morphologisches Jahrbuch* 10: 214'den.)



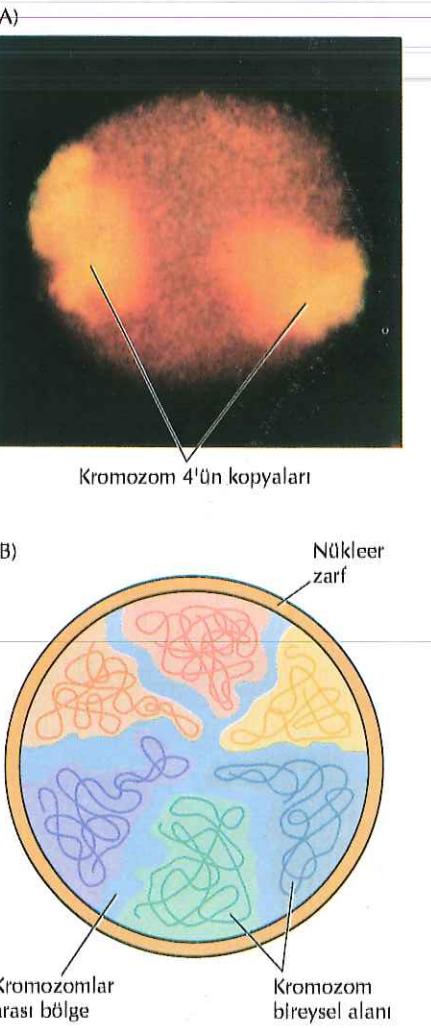
Şekil 8.16 *Drosophila* kromozomlarının organizasyonu
(A) Farklı renklerde beş kromozom kolunun betimlendiği bir nükleus örneği. Sentromer ve telomerlerin yerleşimi belirtilmiştir. (B) Kromozomlar arasındaki topolojik ayrımı örneklemek üzere, kromozom 3 ün iki kolu gösterilmiştir. (D. Mathog et.al., 1984. *Nature* 308: 414'den)

Memeli hücrelerinde her bir kromozom nükleus içerisinde ayrı bir bireysel alanı kaplar (Şekil 8.17). Aktif olarak transkripsiyonu yapılan genler, bu alanların dış kısmında, kromozomları ayıran kanallara bitişik konumlanır. Yeni sentezlenen RNA'ların, RNA işlenmesinin gerçekleştirildiği, bu kromozomlar arası kanallara geçtiği sanılmaktadır. Heterokromatine bağlı proteinlerin nükleer lamina matrisine bağlanması nedeniyle, heterokromatin bölgeler genelde nükleus zarfına yakın bölgede yerleşir. Farklı hücrelerde farklı genler eksprese edildiğinden, seçenekli heterokromatin bölgeleri farklıdır ve değişik hücre ve dokularda nükleer lamina ile etkileşen kromozom bölgeleri de değişir. Bazı hücrelerde sentromer ile telomerler karşıt kutuplara yerleşirken, bazılarında kromozomlar merkezden dışa doğru konuşlanır. Çekirdek içersinde kromozom yerleşiminin gelişi güzel olmamasına karşın, farklı doku ve organizmalarda değişkenlik görülür.

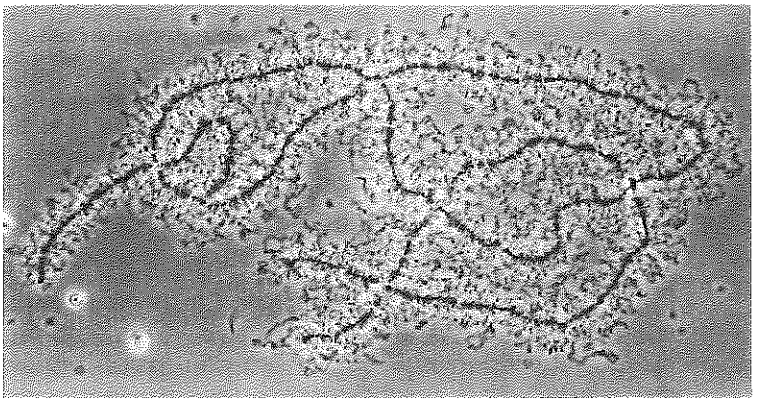
Metafaz kromozomlarının DNA'sı gibi (bkz. Şekil 4.16), interfaz nükleusundaki kromatin de, 50 ila 100 kb civarında DNA içeren ilmik şeklinde bölgeler halinde düzenlenmiştir. Aktif olarak RNA üreten DNA bölgelerinin dağınık kromatin yapısından ilmik çıkıntılar şeklinde görüldüğü amfibi oositlerinin aktif kromozomları, bu ilmik bölgeler şeklinde organizasyona iyi bir örnektir (Şekil 8.18). Bu kromatin bölgeleri, gen ekspresyonunu bağımsız olarak düzenleyen, farklı işlevsel birimleri simgeler (bkz. Bölüm 6).

Nükleusdaki İşlevsel Bölgeler

Nükleusun iç organizasyonu, diğer nükleer süreçlerin nükleusun farklı bölgelerine yerleşimiyle ortaya kondu. Çeşitli nükleus bileşenlerinin, nükleus alt yapıları veya bölgelerine yerleşimleri saptandı. Nükleus alt yapılarının doğası ve işlevleri henüz netleşmemiştir ve nükleus



Şekil 8.17 Memeli nükleusunda kromozomların organizasyonu
(A) Kromozom 4'deki yinelenen dizilere yönelik probla hibridize edilmiş insan hücreleri. Sarı floresans ile belirlenen kromozom 4'ün iki kopyası nükleusta ayrı bireysel bölgelere yerleşir. (B) Bir kromozom organizasyon modeli. Kromozomlar, RNA'ların taşındığı ve işlenmesinin gerçekleştirildiği kromozomlar arası bölgelerle ayrılmış, ayrı bireysel alanları kaplar. (A,Thomas Cremer'in katkısı,Ludwig Maximilians University, A.I. Lamond ve W.C.Earnshaw,1998. *Science* 280:547'den)

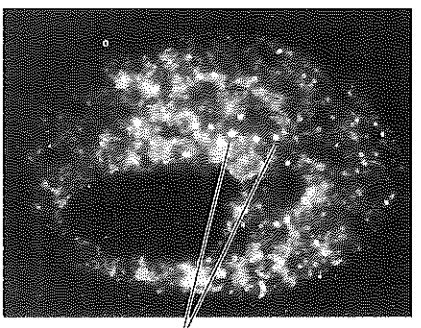


Şekil 8.18 İlmiklenen kromatin bölgeleri
Amfibi oosit kromozomlarının, yüksek düzeyde yoğunlaşmış kromatin ekseninden dışarı uzanan, aktif transkripsiyonu yapılan kromatine ait gevşek ilmiklerin görüldüğü ışık mikroskobu görüntüsü. (Carnegie Enstitüsü'nden Joseph Gall'ün katkısı)

içindeki işlevsel bölgelerin organizasyonları, hücre biyolojisinin tam olarak keşfedilememiş bir alanıdır.

Memeli hücresi çekirdeği, içinde birçok DNA molekülünün replikasyonunun gerçekleştiği, yoğun DNA replikasyon bölgelerine sahiptir. DNA replikasyonunun yer aldığı belirli bölgeler, hücre nükleusunda yeni sentezlenen DNA'nın görüntülendiği çalışmalarla tanımlanmıştır (Şekil 8.19). Bu, DNA yapısına katılabilen bir timin analoğu olan ve daha sonra floresan antikorla boyanarak belirlenebilen bromodeoksiüridinin hücreleri işaretlemek için kullanılmasıyla sağlandı. Bu gibi deneylerle, tüm nükleusa yayılmış 200 kadar ayrı bölgede yeni sentezlenmiş DNA saptandı. Diploid memeli hücresinde her hangi bir zaman diliminde yaklaşık 4000 aktif replikasyon orijini bulunduğundan, DNA replikasyonu yığılımlarının her birinde 40 kadar replikasyon çatalı bulunur. Böylece, DNA replikasyonunun, replikasyon fabrikaları olarak adlandırılan ayrı işlevsel bölgeler halinde organize olmuş, çok sayıda replikasyon kompleksini kapsayan, geniş alanlarda yer aldığı anlaşılmaktadır.

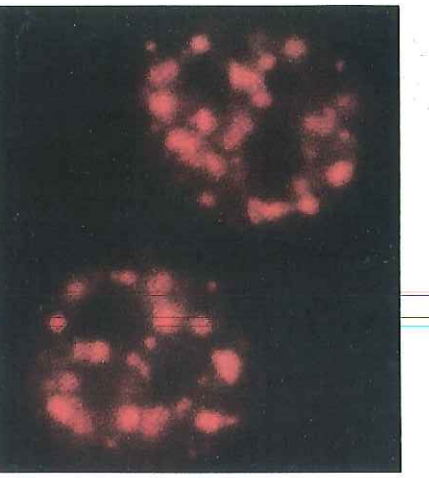
Aktif olarak transkripsiyonu yapılan genlerin nükleusun her yanına yayılmış olmasına karşın, kesip-ekleme sistemi bileşenleri, farklı çekirdek altı yapısal bölgelerde yoğunlaşmıştır. Kesip-ekleme bileşenlerinin nükleus içerisinde belirli bölgelere yerleşimleri, snRNP ve kesip-ekleme faktörlerine karşı antikorlarla immünfloresan boyamayla belirlenmiştir (Şekil 8.20). Kesip-ekleme sisteminin bileşenleri, nükleus içerisinde eşit şekilde dağılmış olmayıp, nükleer benekler olarak adlandırılan, 20 ila 50 belirgin yapıda yoğunlaşmışlardır. Bu beneklerin, daha sonra buradan ayrılıp, pre-mRNA işlenmesinin yer aldığı aktif RNA sentezlenen gen bölgelerine



Şekil 8.19 DNA replikasyonu yoğun bölgeler
Yeni sentezlenen DNA, hücrelerin, timidin yerine DNA'ya katılan bromodeoksiüridinle kısa muamelesi ile işaretlenir. Bu değişim, nükleusun bromodeoksiüridine karşı antikorla boyanması sonrasında immünfloresansla yeni sentezlenen DNA'nın belirlenmesini sağlar. Yeni sentezlenen DNA'nın nükleus içersinde belirgin kümeler halinde yayılmış olduğuna dikkat ediniz. (Ronald Berezney, SUNY/Buffalo izniyle.)

giden kesip-ekleme bileşenlerinin depolandıkları yerler olduğu düşünülmektedir.

Nükleusta benekler dışında, morfolojileri bir diğerinden farklı olan yapılar veya bölgeler bulunur. Nukleolus (aşağıda tartışıldı), Cajal ya da kangal cisimler (Şekil 8.21) ve PML cisimler, en önemli üç nükleer bölgeyi oluşturur. Cajal ya da kangal cisimler, küçük RNP'ler bakımından zengindir ve RNP yapılanma bölgesi işlevi gördükleri düşünülmektedir. PML cisimlerinin işlevleri bilinmemektedir; RNP bakımından zengin değildir, DNA replikasyonu ya da transkripsiyon alanları da değildirler. Bu nükleer yapılar her ne kadar nükleus içerisinde bir alt yapılanmanın var olduğunu gösteriyorsa da, işlevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 8.20 Kesip-ekleme bileşenlerinin yerleşimi
İmmünfloresan antikorlarla boyama, kesip-ekleme faktörlerinin çekirdek içerisinde ayrı bölgelerde yoğunlaşmış olduğunu gösterdi. (David L.Spector'nin izniyle, Cold Spring Harbor Laboratory)

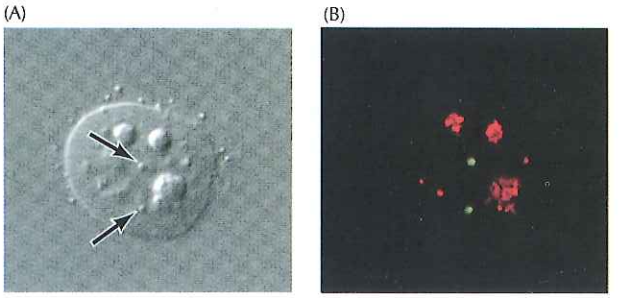
Nükleolus

Çekirdek içerisinde en dikkat çekici altyapı, rRNA'ların sentezlendiği, işlendiği ve ribozomların oluşturulduğu yer olan, **nükleolus** (çekirdekçik) dur (bkz. Şekil 8.1). Bir önceki bölümde tartışıldığı gibi, hücre belli zamanlarda protein sentez gereksinimini karşılamak için fazla sayıda ribozoma gereksinim duyar. Aktif olarak çoğalan memeli hücresinde 5 ila 10 milyon civarında ribozom bulunur ve bunların, her bölünmede sentez edilmeleri gerekir. Nükleolus, denetimli ve yeterli rRNA sentezi ile ribozomal alt birim yapılanması gereksinimini karşılayan bir ribozom fabrikası olarak çalışır. Yakın zamandaki araştırmalar, çekirdekçiğin RNA modifikasyonunda daha genel bir rol oynadığını ve farklı tipteki RNA'ların işlenmelerinin belirli aşamalarında nükleolus bölgesine girip çıktıklarını gösterdi.

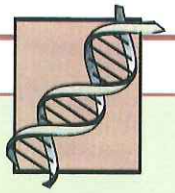
Ribozomal RNA Genleri ve Nükleolusun Organizasyonu

Çekirdekçik bir zarla çevrili değildir ve 5.8S, 18S ve 28S rRNA'ların genlerini içeren kromozomal bölgelerle ilişkilidir. Yüksek ökaryotların ribozomları 5S, 5.8S, 18S ve 28S rRNA olmak üzere, dört tip RNA içerir (bkz. Şekil 7.4). 5.8S, 18S ve 28S rRNA'lar nükleolusda, RNA polimeraz I tarafından tek bir birim halinde sentezlenir, 45S ribozomal öncü RNA meydana gelir (Şekil 8.22). 45S pre-rRNA 40S (küçük) ribozomal alt birimde yer alan 18S rRNA'ya ve 60S (büyük) ribozomal alt birimde yer alan 5.8S ve 18S rRNA'ya işlenir. 60S alt birimde yer alan 5S rRNA nükleolus dışında, RNA polimeraz III tarafından üretilir.

Çok sayıda rRNA molekülünün transkripsiyon gereksinimini karşılamak için, bütün hücrelerde çok sayıda rRNA gen kopyasını bulunur. Örneğin insan genomunda, 5.8S, 18S ve 28S rRNA'ları kodlayan 200 kadar gen kopyası ve 5S rRNA kodlayan 2000 civarında



Şekil 8.21 Nükleusda Cajal cisimler
(A) Hela hücresi çekirdeğinin diferansiyel interferens kontrast mikroskop görüntüsü. Oklar iki Cajal cismini işaret etmektedir. (B) Aynı çekirdeğin Koilin (yeşil) ve Fibrillarin (kırmızı) proteinlerine karşı antikorlarla immunfloresan boyanması. Fibrillarin hem nükleusun yoğun ipliksi bölgelerinde hem de Cajal yapıda bulunur. Koilin ise sadece Cajal cisimlerde belirlenebilir. (J.G.Gall, 2000. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273'den)



MOLEKÜLER TIP

Nükleer Lamina Hastalıkları

Hastalıklar

Emery ve Dreifuss 1966'da X-kromozomuna bağlı yeni bir kas distrofisi tanımladılar. Hastalığın erken döneminde, etkilenen bireyde, dirsekler, boyun ve topuk sertleşir ve genellikle kalpte ileti engeli oluşur. Bu belirtiler 10 yaş civarında ortaya çıkar, topuklardaki Aşil tendonunun sertleşmesi nedeniyle parmak-yürüyüşü ve dirsekleri bükme zorluğu gelişir. Kalp sorunları 20 yaş civarında ortaya çıkar ve kalp atışı düzenleyen aygıt (pacemaker) gerekebilir. Omuz ve üst koldaki kaslarda giderek kayıp ve zayıflık gelişir aynı durum bacaklarda baldır kaslarında da görülür, fakat bu yavaş gelişir ve genellikle, ileri yaşlara kadar sorun oluşturmaz.

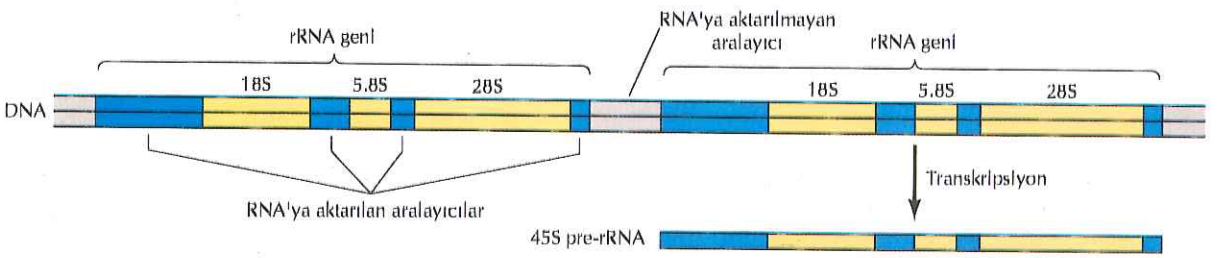
Araştırıcılar, yaklaşık 30 yıl sonra, bu X-e bağlı Emery-Dreifuss kas distrofisinin yeni bir transmembran proteindeki mutasyonlardan kaynaklandığını gösterdiler. Alan Emery'e ithafen proteine emerin dediler. Kısa sürede, birçok araştırma grubu, emerinin iç nükleer zarda bulunan bir protein olduğunu ve X-e bağlı Emery-Dreifuss kas distrofisi hastalarında bulunmadığını gösterdiler. Bu beklenmedik bir şeydi; Tüm hücrelerde sentezlenen bir nükleer zarf proteini dokuya özgül bir hastalık oluşturmaktaydı. Bütün vücut hücreleri bu proteinden yoksun olmasına karşın, hastalık sadece kaslarda ortaya çıkıyordu. Daha sonraki araştırıcılar, aynı bozukluğun cinsiyete bağlı olmadan da kalıtılabildiğini buldular. Cinsiyete bağlı olmayan bu Emery-Dreifuss kas distrofisi görülen ailelerde, nükleer lamin A ve C proteinlerini kodlayan tek gen olan *LMNA* geninde mutasyon bulundu. Sonuç olarak, biri nükleus iç zar proteinini kodlayan ve biri de temel nükleer lamini kodlayan iki gendeki mutasyon, klinik olarak birbirinin aynı kas distrofilerine yol açıyordu.

Daha da ilginci, yapılan benzer araştırmalarda, Dunnigan-tipi kısmi lipodistrofi ve Charcot-Marie-Tooth bozukluğu tip 2B1 gibi farklı hastalıklarda, *LMNA* geninde farklı mutasyonların izleri bulundu. Önceleri hekimler bu hastalıkları, kalıtım biçimleri ve kinik belirtilerine dayalı olarak değerlendirip farklı hastalıklar olarak sınıflandırdılar.Yakın zamanda yapılan çalışmalar, diğer bir çekirdek iç zar proteini olan lamin B reseptörünün mutasyonlarının Pelger-Huët anomalisinin temel nedeni olduğunu ortaya çıkardı.

Moleküler ve Hücresel Temel

Biyologların çoğu, laminlerdeki mutasyonların nükleer yapıda genel bozukluklara ve hızlı bölünen hücrelerde ciddi sorunlara neden olacağını düşündüler. Bununla birlikte, hastalarda çekirdek yapısında, sadece küçük değişikler görülür. Bu durumda asıl bilmece, nükleer laminler veya lamine bağlanan proteinlerdeki mutasyonların nasıl olup da dokuya özgül farklı hastalıkları oluşturduğudur. Yanıt henüz bilinmemekle birlikte, iki hipotez geliştirilmiştir. Birincisi "gen ekspresyonu" hipotezidir. Burada, iki lamin proteini A ve C'nin nükleer zarfla doğru etkileşiminin, dokuya özgü belli genlerin ekspresyonu için şart olduğunu ileri sürer. Transkripsiyonu yapılmayan genler tercihen çekirdeğin kenarlarına yerleşirken, hücre tipine göre ekspresyonu yapılan genler çekirdeğin merkezinde yoğunlaşmışlardır. Bu nedenle, bu hastalıkların temelini, hatalı protein etkileşimleri nedeniyle gelişen, gen ekspresyonu değişiklikleri oluşturmaktadır.

"Mekanik stres" hipotezinde, nükleer lamin-emerin kompleksinde mutasyonun hücre içi iskelet sisteminin bütünlüğünü etkilediği düşünülmüştür. Bütün hücrelerde, lamina, iç çekirdek zarı ve nükleer por kompleksleri birbirlerine sıkıca bağlıdır. Özellikle kas distrofileri için geçerli olan bu hipotez, nükleer por



Şekil 8.22 Ribozomal RNA genleri
Her bir rRNA geni, 18S, 5.8S ve 28S rRNA ile, kopyalanan ara dizileri içeren tek bir transkripsiyon birimidir. rRNA genleri, transkribe olmayan aralayıcı DNA'larla ayrılmış ardışık diziler şeklinde düzenlenmiştir.

kompleksl erine bağlı filamanlar aracılığıyla, laminanın kas hücresi hücre iskeletiyle dolaylı bağlantı kurabileceğini ileri sürer.

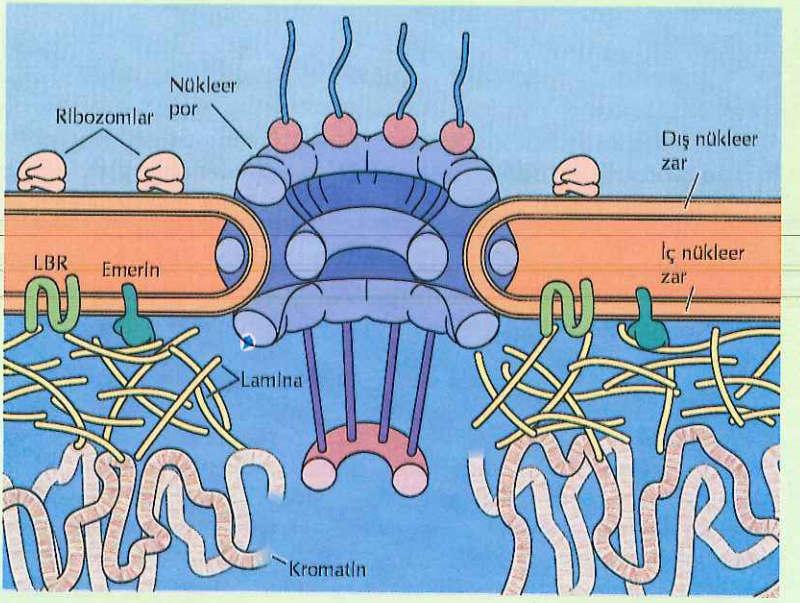
Önlem ve Tedavi

Nükleer lamina kompleksinde yer alan genel proteinlerdeki mutasyonların, farklı kalıtımsal dokuya-özgü hastalıkların nedeni olarak saptanması, bilim adamlarına sürpriz olmuş ve nükleus zarfına bakış açılarının değişmesine yol açmıştır. Bu hastalıkların temelinde, mekanik bir düzenlemenin mi yoksa gen ekspresyonunun mu olduğu konusunda daha ileri araştırmalara gereksinim vardır. Hastalıkların moleküler nedenlerinin bilinmesi, tanıyı kolaylaştırmakta ve bu yolla tedavilerine de imkan vermektedir. *LMNA* geninin işlev dışı bırakıldığı fare modellerindeki son gelişmeler, ilk basamağı oluşturuyor. Embriyolar geliştikçe, Emery-Dreifuss kas distrofisinin belirtileri görülmektedir. Sonuç olarak araştırıcılar, yavaş gelişen birçok doğumsal hastalığın nükleer "laminopatilerin" yeni üyeleri olabileceğinin bilincindeler.

Kaynaklar

Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y.K., T. Tsukahara and K. Arahata 1996. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 12: 254-259.

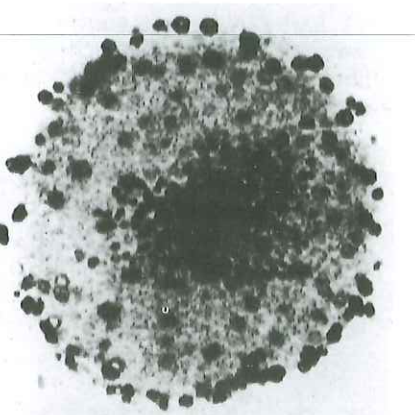
Worman, H. J. and J. C. Courvalin 2002. The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol.* 12: 591-598.



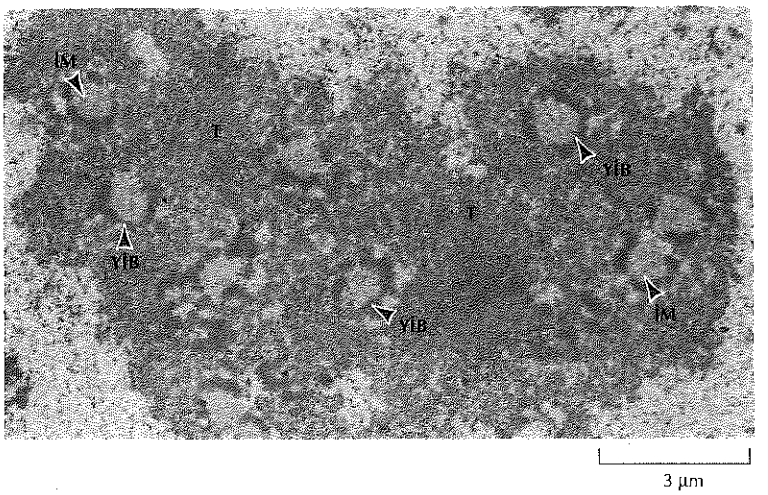
Memeli nükleer zarfı ve nükleer laminası. İç nükleus zarı, nükleer laminlerle etkileşen birçok protein içerir. Transmembran proteinleri olan emerin ve lamin B reseptörü (LBR) örneklerdir. Lamina kromatinle de etkileşir.

gen kopyası bulunmaktadır. 5.8S,18S,ve 28S rRNA genleri, ardışık diziler halinde, beş farklı kromozomda toplanmıştır (kromozom 13, 14, 15, 21 ve 22); 5S rRNA genleri tek ardışık dizilim olarak kromozom 1'de bulunur.

Ribozom üretiminin önemi özellikle oositlerde görülür, erken embriyo döneminde gereksinim duyulan çok sayıda ribozom üretimi için rRNA genleri amplifiye edilir. *Xenopus* oositlerinde rRNA genleri 2000 kat amplifiye olarak, hücre başına bir milyon kopyaya ulaşılır. Amplifiye olan rRNA genleri binlerce nükleolusa dağılır (Şekil 8.23) ve oosit başına yaklaşık 10^{12} ribozomun birikmesi sağlanır.



Şekil 8.23 Amfibi oositlerinde nükleolus
Xenopus oositlerinde amplifiye edilen rRNA genleri, çok sayıda çekirdekcikde birikir (koyu boyanan benekler).(D.D. Brown and I.B.Dawid,1968. *Science* 160: 272'den)



Şekil 8.24 Nükleolusun yapısı
Nükleolusun elektron mikroskobik fotoğrafında ipliksi merkezin (İM) yoğun ipliksi bileşenlerin (YİB) ve tanecikli bileşenlerin (T) görünümü. (David L.Spector'un izniyle, Cold Spring Harbor Laboratory)

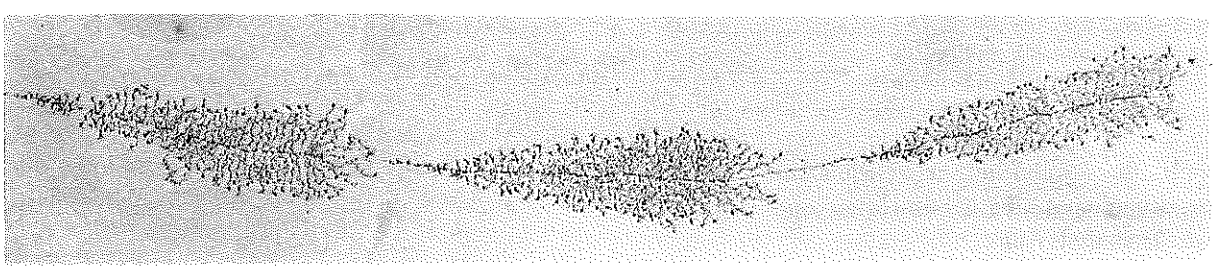
Nükleoluslar morfolojik olarak, bir diğerinden ayırt edilebilen üç bölümden oluşmaktadır: ipliksi bir merkez, yoğun ipliksi bileşen ve tanecikli bileşen (Şekil 8.24). Bu farklı alanlar, olasılıkla, rRNA transkripsiyonu, işlenmesi ve ribozom yapılanması aşamalarının geçtiği yerlerdir. Sinyal tanıyan partikül gibi (bkz. Bölüm 9) diğer küçük RNA'ların modifikasyonları, nükleolusda başka bölgelerde gerçekleşir.

Her hücre bölünmesini takiben, nükleoluslar 5.8S,18S ve 28S rRNA genlerini içeren kromozom bölgeleriyle bir araya gelir, bu nedenle **nükleolusu oluşturan bölge** olarak adlandırılır. Nükleolusların oluşması için, 45S pre-rRNA'nın transkripsiyonuna gereksinim vardır, bunu, işlemleme faktörleri ve çekirdekçiğin diğer bileşenlerini içeren küçük nükleolus öncül yapıların birleşmesi izler. Hücrelerin çoğunda, başlangıçta ayrı olan nükleoluslar kaynaşarak tek bir nükleolus oluşturur. Nükleolusun boyutları bulunduğu hücrenin metabolik aktivite düzeyine bağlıdır ve aktif protein sentezi yapanlarda büyük nükleolus bulunmaktadır. Bu farklılık esas olarak, ribozom kurulumunun gerçekleştirildiği tanecikli bileşenlerin boyutuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

rRNA Transkripsiyonu ve İşlenmesi

Her nükleolus oluşturan bölge, bir diğerini takip eden ve aralarında transkripsiyonu yapılmayan aralayıcı bölgeler bulunan, rRNA gen toplulukları içerir. Bu genlerin RNA polimeraz I tarafından, elektron mikroskobunda görülebilir düzeyde, çok aktif olarak transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil 8.25). Bu elektron mikroskobik resimlerde, ardışık

Şekil 8.25 rRNA genlerinin transkripsiyonu
Nükleolar kromatinin elektron mikroskobik görüntüsünde, transkripsiyonu yapılmayan aralayıcı dizilerle ayrılmış, üç rRNA geninin görünümü. Her bir rRNA geni, uzayan RNA zincirleriyle, yıl başı ağacı görüntüsü oluşturacak şekilde çevrelenmiştir. (O.L.Miller, Jr. izniyle)

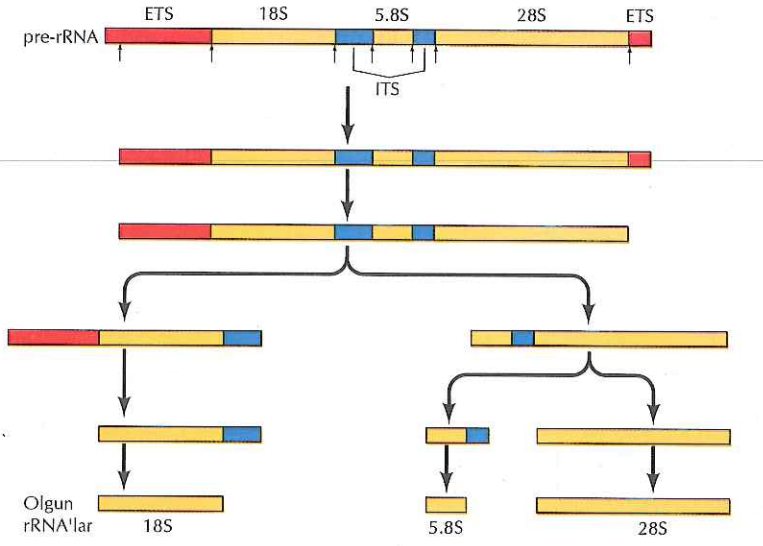


dizili rRNA genlerinin, uzayan RNA zincirlerinin yoğun paketiyle, yıl başı ağacına benzer şekilde kaplandığı görülür. Uzayan RNA zincirlerinin aşırı yoğunluğu, DNA kalıbında, en yoğun durumda yaklaşık her yüz baz çiftinde bir yerleşen RNA polimeraz moleküllerini yansıtmaktadır.

Yüksek ökaryotlarda rRNA genlerinin ilk transkripti, 18S, 5.8S ve 28S rRNA'ları ve RNA'ya aktarılan aralayıcı dizileri içeren, 45S pre-RNA'dır (Şekil 8.26). Transkripsiyonu yapılan dış aralayıcılar, 45S pre-rRNA'nın 5've 3'ucunda bulunurken, iki iç aralayıcı 18S, 5.8S ve 28S arasında yer alır. Başlangıç işlemleme aşaması, transkripsiyonun erken döneminde yer alan pre-RNA'nın 5'ucundaki aralayıcının kesimidir. Bu kesim pre-RNA'nın 5' ucuna bağlı kalan U3 küçük nükleolar RNP (aşağıya bakınız) gerekli olup, Şekil 8.25'de görülen karakteristik yumruları oluşturur. Transkripsiyon tamamlanınca, molekülün 3'ucundaki aralayıcı uzaklaştırılır. İnsan hücrelerinde bu işlemleri, 5.8S bölgesinin 5'ucundan kesim izler ve böylece 18S ve 5.8+28S rRNA öncülleri oluşur. Ek kesimlemeler sonunda olgun rRNA'lar oluşur. Bu işlemler, kesim sıralamasındaki bazı farklılıklarla birlikte, diğer türlerde de benzer yol izler.

Pre-rRNA'nın işlenmesinde kesimlemeye ek olarak, belli bazlara ve riboz birimlerine metil guruplarının eklenmesi ve ayrıca üridinin psödoüridine çevrilmesini içeren önemli miktarda baz modifikasyonu gerçekleşir (bkz. Şekil 6.40). Hayvan hücrelerinde, pre-rRNA işlenmesi yaklaşık yüz riboz biriminin ve on nükleotidin metillenmesini ve ayrıca, yüz psödouridin oluşumunu kapsar. Bu değişikliklerin çoğu pre-RNA sentezi sırasında ya da hemen sonra gerçekleşir, ancak çok azı pre-rRNA işlenmesinin ileri aşamalarında yer alır.

Pre-rRNA'nın işlenmesi, nükleolusda yerleşik proteinlere ve RNA'lara gereksinir. Küçük nükleer RNA'ların (snRNA) pre-mRNA'nın kesilip-eklenmesi ile ilişkisi Bölüm 6'da tartışıldı. Nükleoluslar, pre-rRNA'nın işlenmesinde görev alan 300'den fazla protein ve çok sayıda (yaklaşık 200) **küçük nükleolar RNA'lar**

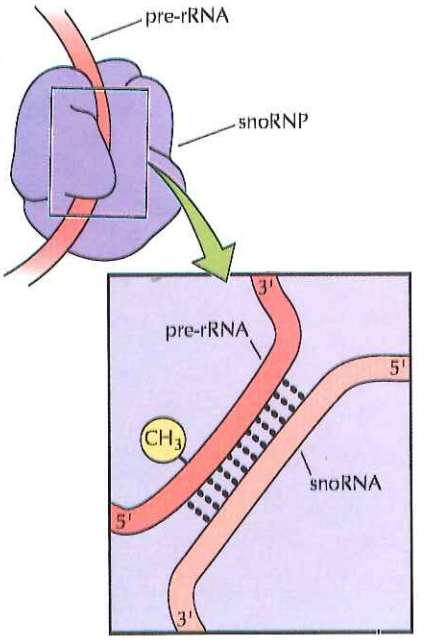


Şekil 8.26 pre-rRNA'nın işlenmesi
45S pre-RNA transkripti her iki ucunda, transkribe olan dış aralayıcılar (ETS) ve 18S, 5.8S ve 28S rRNA'lar arasında yer alan, transkribe olan iç aralayıcılar (ITS) bulundurur. Pre-RNA bir dizi kesimlemeyle, olgun rRNA oluşturmak üzere işlenir (insan pre-RNA'sı için betimlenmiştir).

(snoRNA'lar) bulundurur. Splisozomal snRNA'larda olduğu gibi, snoRNA'lar da proteinlerle kompleks yaparak snoRNP'leri oluştururlar. Her bir snoRNP, tek snoRNA ile sekiz ila on proteinden oluşur. Pre-mRNA üzerinde splisozomların şekillenmesindekine benzer yolla snoRNP'ler pre-rRNA'larla birleşerek işlem komplekslerini oluşturur.

Bazı snoRNA'lar, 18S, 5.8S ve 28S ürünlerini oluşturmak üzere, pre-rRNA'nın kesilmesinden sorumludur. Örneğin, en yaygın snoRNA, her hücrede 200,000 kopyası bulunan U3'dür. Daha önce bahsedildiği gibi, pre-rRNA'nın 5'dış ucundaki aralayıcıdan başlangıç kesimi için U3 gereklidir. Benzer şekilde U8 snoRNA pre-rRNA'nın 5.8S ve 28S rRNA'lara, U22 snoRNA da, pre-rRNA'nın 18SrRNA'ya kesilmesinden sorumludur.

snoRNA'ların çoğu, rRNA oluşumunda, özgün ribozlarının metillenmesi ve psödoüridin oluşumu gibi baz modifikasyonlarını sağlayan kılavuz RNA'lar olarak rol oynarlar (Şekil 8.27). snoRNA'ların çoğu, 18S ve 28S rRNA'lara tamamlayıcı, 15 nükleotidlik kısa diziler içerirler. Bu dizilerin, rRNA'da modifiye edilmiş olan baz dizileriyle komplementer olması ilginçtir. pre-RNA'daki özgün baz dizileriyle baz çifti oluşturan snoRNA'lar, pre-RNA molekülünde psödoüridin dönüşümünün ve metilasyonun yapılacağı belirli diziye enzimi yönlendiren kılavuz RNA'lar olarak davranmaktadır. rRNA'lar dışında diğer RNA'lar için de baz modifikasyonu gerekir ve snoRNA'ların nükleolusta yerleşimlerinin, RNA modifikasyonundaki genel rolleri için gerekli olduğu kabul edilmektedir. Sinyal tanıyıcı RNA partikülü buna bir örnektir (bkz. Bölüm 9).

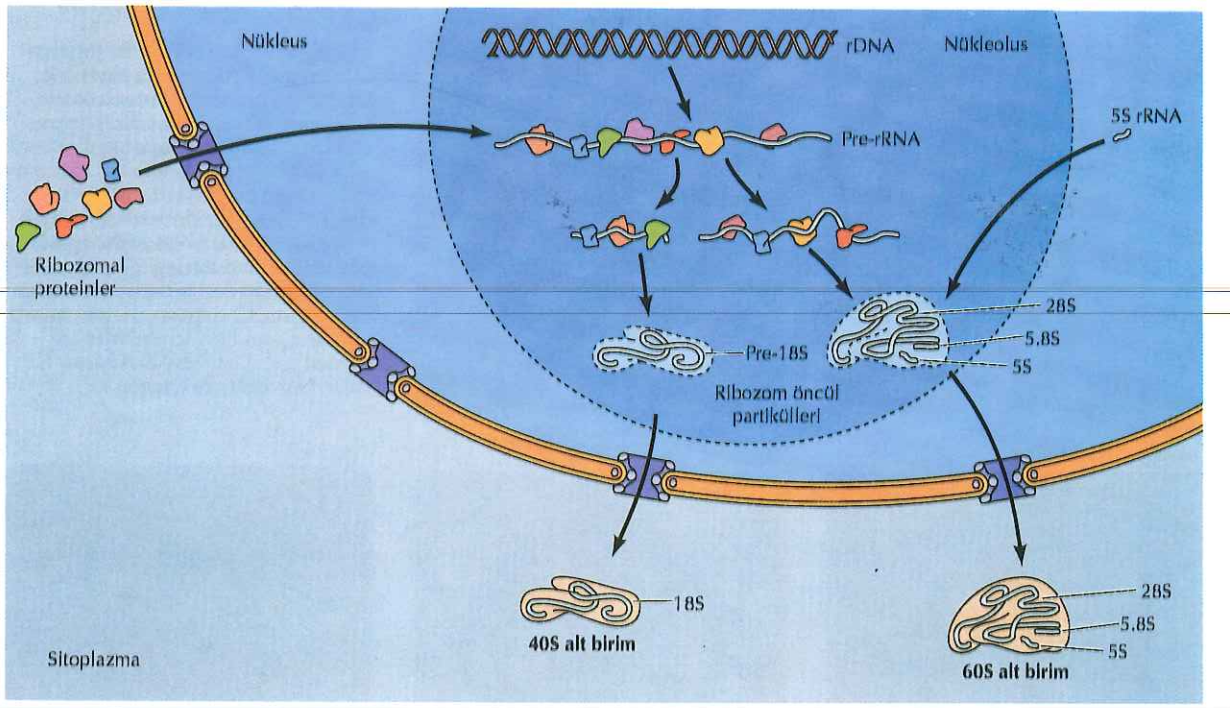


Şekil 8.27 pre-rRNA baz modifikasyonunda snoRNA'ların rolü
snoRNA'lar rRNA'ya komplementer kısa diziler içerirler. snoRNA'lar ile pre-RNA'lar arasında baz eşleşmesi, baz modifikasyonu (örn., metilasyon) yapacak enzimi pre-RNA'da uygun yere yönlendirir.

Ribozom Yapılanması

Ribozomların yapılanması, ribozomal öncül RNA ile ribozomal proteinlerin ve 5S rRNA'nın bir araya gelmesini gerektirir (Şekil 8.28). Ribozomal proteinleri kodlayan genler, RNA polimeraz II ile nükleolus dışında kopyalanır ve sentezlenen mRNA'ların proteine çevrimi sitoplazmik ribozomlarda gerçekleşir. Ribozomal proteinler daha sonra sitoplazmadan nükleolusa taşınırlar ve burada rRNA'lar ile birleşerek, öncül ribozomal partikülleri oluştururlar. 5S rRNA geninin transkripsiyonu nükleolus dışında, RNA polimeraz III enzimiyle yapılmasına karşın, 5S rRNA'lar öncül ribozomal partiküllerle nükleolusda birleşir.

Ribozomal proteinler rRNA'larla birleşmeye başladığında pre-RNA'nın sentezi sürmektedir ve ribozomal proteinlerin yarısından fazlası pre-RNA ile, kesilmesinden önce birleşir. Kalan ribozomal proteinler ve 5S rRNA, pre-RNA'nın işlenmesi sürerken, öncül ribozomal partiküle eklenirler. Ribozom yapılanmasının erken döneminde iki ribozomal alt birim birbirinden ayrı işlenir. Sadece 18S RNA içeren küçük alt birimin işlenmesi, sadece dört endonükleaz kesimi gerektiren basit bir işlemdir. Olgun 18SrRNA oluşumu için son kesim, 40S alt birimin sitozole taşınmasından sonra gerçekleşir. 28S, 5.8S ve 5S rRNA içeren büyük alt birimin işlenmesi, kapsamlı nükleaz kesimi gerektirir ve bu işlemler nükleolusta tamamlanır. Sonuç olarak, nükleolusdaki öncül ribozomal partiküllerin çoğu, büyük (60S) alt birimin öncülleridir. Ribozom olgunlaşmasının son basamağı, ribozom öncüllü partiküllerin sitoplazmaya taşınması ve ökaryotlarda 40S ve 60S aktif ribozom alt birimlerinin oluşumudur.



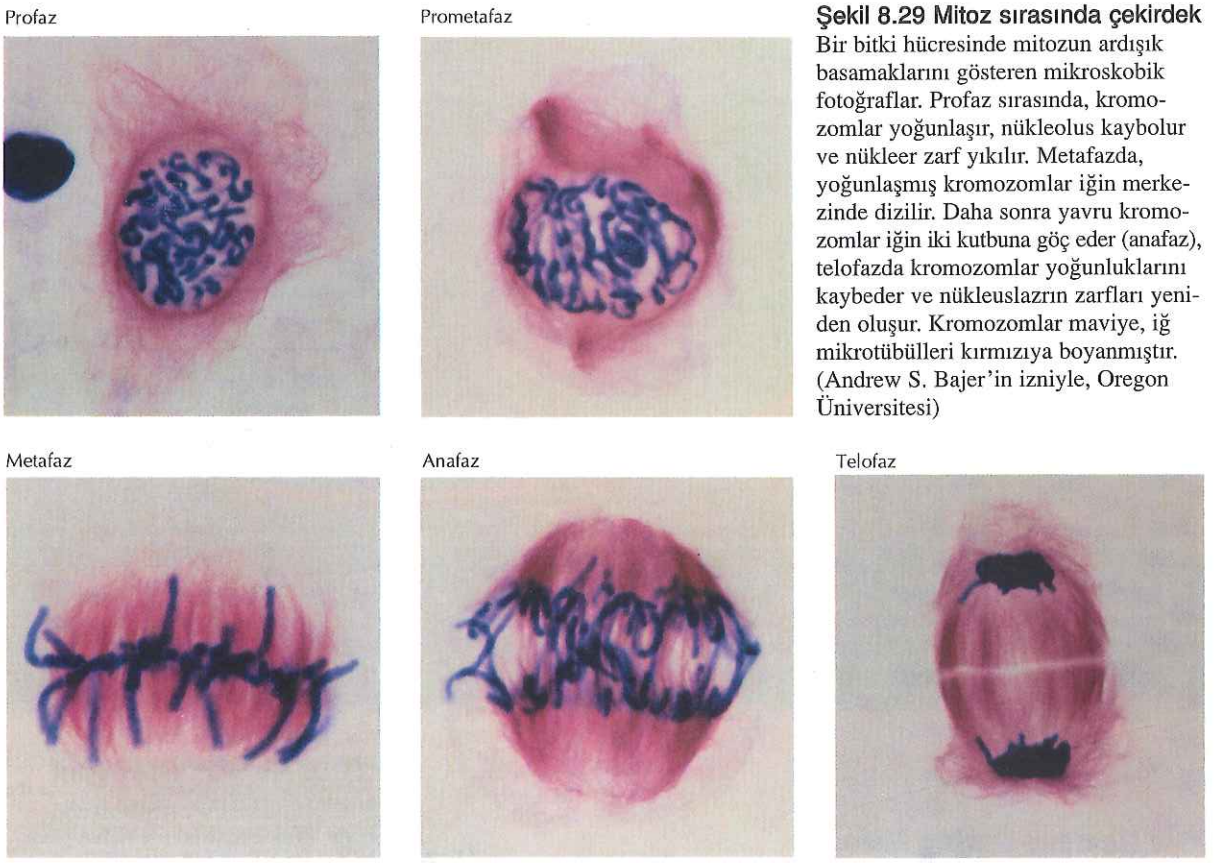
Şekil 8.28 Ribozom yapılanması
Ribozomal proteinler sitoplazmadan nükleusa taşınırlar ve henüz kesilmemiş pre-rRNA ile birleşirler. pre-rRNA işlendiğinde ek ribozomal proteinlerin ve 5SrRNA (nükleusun farklı bir yerinde sentezlenir) eklenmesiyle ribozom öncül partikülleri oluşur. Olgunlaşmanın son aşamasında, ribozom öncül partikülleri, 40S ve 60S ürünleri oluşturmak üzere sitoplazmaya gönderilir.

Mitoz Sürecinde Nükleus

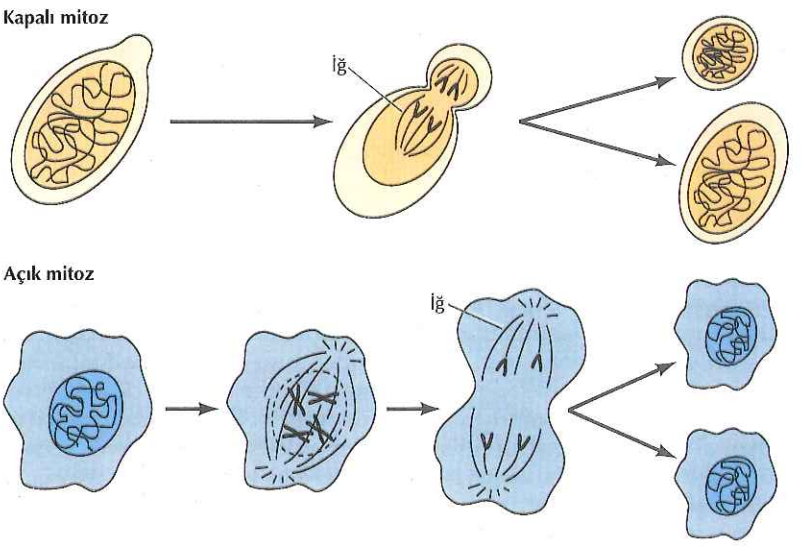
Nükleusun eşsiz bir özelliği, bölünen hücrelerin çoğunda, her bölünmede bileşenlerine ayrışması ve yeniden yapılanmasıdır. Mitozun başlangıcında, kromozomlar yoğunlaşır, nükleolus kaybolur ve nükleer zarf yıkılır ve nükleus içerisindeki materyalin büyük bölümü sitoplazmaya dağılır. Mitozun sonundaysa bu işlemlerin tersi gerçekleşir: Kromozomlar yoğunluğunu yitirir, nükleer zarf, ayrılan yavru kromozom setlerini birbirinden ayıracak şekilde yeniden oluşur. Bölüm 14'de mitoz kapsamlı bir şekilde tartışılmaktadır; bu bölümde nükleusun dağılması ve yeniden yapılanması mekanizmaları dikkate alınmaktadır. Bu işlemler, ökaryot hücrelerinde mitozun düzenlenmesinde kritik rol oynayan Cdc2 protein kinazın da kısmen etkilediği, nükleer proteinlerin geri dönüşümlü fosforillenmesi ve defosforillenmesi ile kontrol edilmektedir.

Nükleer Zarfın Dağılması

Hücrelerin çoğunda, çekirdek zarfının yapısının bozulması mitozda profaz döneminin sonunu belirler (Şekil 8.29). Nükleus bütünlüğünün bozulması mitozun yaygın bir özelliği değildir ve tüm hücrelerde gerçekleşmez. Bazı tek hücreli ökaryotlarda (örn., mayalar), nükleer zarfın bütünlüğünü koruduğu, kapalı mitoz görülür (Şekil 8.30). Kapalı mitozda, yavru kromozomlar nükleusun zıt kutuplarına göç ederler ve nükleus ikiye bölünür. Yüksek ökaryot hücrelerinde ise genellikle nükleer zarfının yıkılmasıyla karakterize açık mitoz gerçekleşir. Yavru kromozomlar mitotik iğin zıt kutuplarına göç eder ve çevrelerinde nükleus yeniden yapılanır.



Şekil 8.29 Mitoz sırasında çekirdek Bir bitki hücresinde mitozun ardışık basamaklarını gösteren mikroskobik fotoğraflar. Profaz sırasında, kromozomlar yoğunlaşır, nükleolus kaybolur ve nükleer zarf yıkılır. Metafazda, yoğunlaşmış kromozomlar iğin merkezinde dizilir. Daha sonra yavru kromozomlar iğin iki kutbuna göç eder (anafaz), telofazda kromozomlar yoğunluklarını kaybeder ve nükleuslazrın zarfları yeniden oluşur. Kromozomlar maviye, iğ mikrotübülleri kırmızıya boyanmıştır. (Andrew S. Bajer'in izniyle, Oregon Üniversitesi)

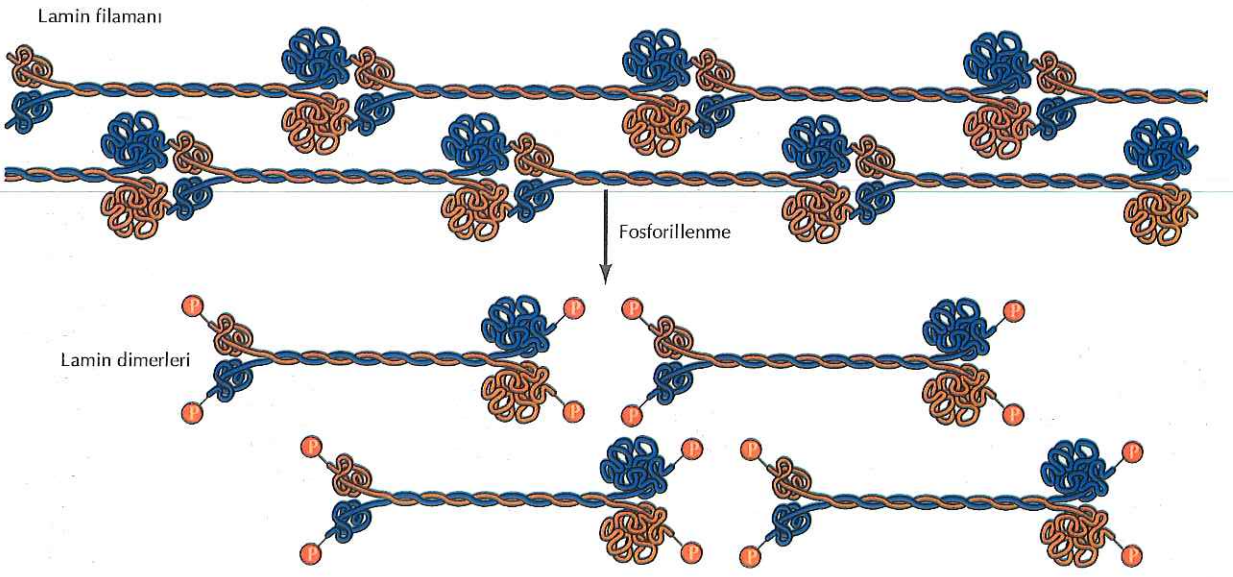


Şekil 8.30 Kapalı ve açık mitoz Kapalı mitozda nükleus zarfı sağlam kalır ve kromozomlar, nükleus içindeki iğin zıt kutuplarına göç ederler. Açık mitozda, nükleus zarfı yıkılır ve daha sonra, ayrılmış olan iki kromozom seti etrafında yeniden oluşur.

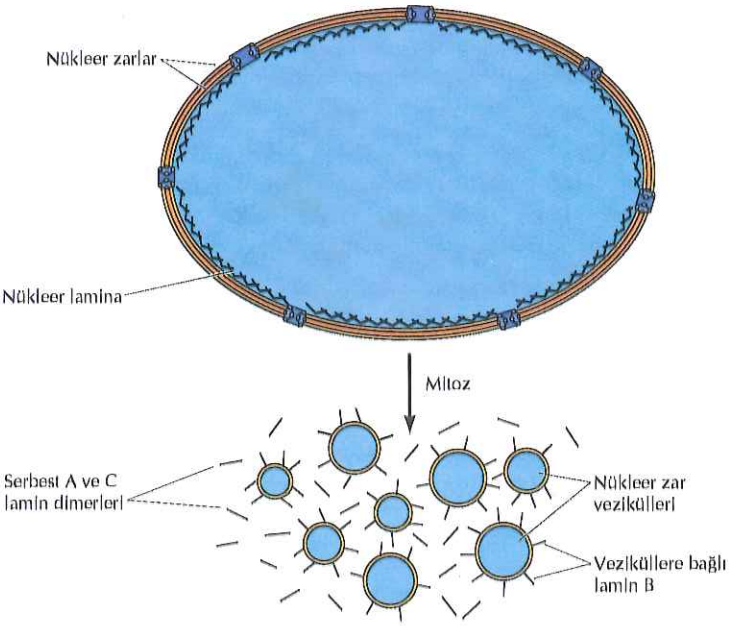
Nükleus zarfının yıkımı, endoplazmik retikulumun benzer şekilde yıkımıyla paralel olarak, her üç bileşeninde değişiklik gerektirir: Nükleer zarlar veziküllere parçalanır, nükleer por kompleksi ayrışır ve nükleer zarın altını kaplayan örülmüş filaman yapısındaki nükleer lamina dağılır. Nükleer lamina, lamin denilen ipliksi proteinlerden oluşur, laminler birbirleriyle birleşerek filamanları oluştururlar. Nükleer laminanın dağılması, filamanların lamin dimerlerine yıkılmasına neden olan lamin fosforillenmesinin sonucudur (Şekil 8.31). Laminlerin fosforillenmesi, Bölüm 7'de tanımlanan (bkz. Şekil 7.41) ve Bölüm 14'de mitozun merkezindeki düzenleyici olarak tartışılacak olan Cdc2 protein kinaz tarafından gerçekleştirilir. Cdc2 (ve mitozdaki hücrede aktive olan diğer protein kinazlar) farklı tipteki tüm laminleri fosfatlar ve izole nükleusların Cdc2 ile muamelesinin, nükleer laminanın ayrışması için yeterli olduğu gösterilmiştir. Nükleer laminanın yıkılmasında laminlerin fosforillenmesinin gerekliliği, fosfat bağlanamayan mutant laminlerin senteziyle gösterilmiştir. Bu mutant laminleri sentezleyen genler hücrelere yerleştiğinde, hücreler mitoza girdiğinde nükleer laminanın yıkılmadığı görülür.

Nükleer laminanın dağılmasıyla birlikte, nükleer zar da veziküllere parçalanır (Şekil 8.32). B-tipi laminler bu keseciklere bağlı kalır, lamin A ve C ise nükleus zarından ayrılır ve sitoplazmada serbest dimerler olarak kalır. Bu faklılık, B-tipi laminlerin lipid (prenil gurupları) ilavesiyle kalıcı olarak değiştirilmiş olmalarına karşın, A ve C tipi laminlerde laminaya katılımlarından sonra C-ucu prenil gruplarının proteolizle uzaklaştırılmış olmasından kaynaklanmaktadır. Nükleer por kompleksleri de, yapılarındaki bir kaç por proteininin fosforillenmesiyle, alt birimlerine ayrılırlar. Nükleus zarı iç proteinleri de mitozda fosfatlanır ve bu proteinlerin fosforillenmesi, vezikül oluşumunda ve kromozom ve nükleer laminanın nükleus zarından ayrılmasında önemli olabilir.

Şekil 8.31 Nükleer laminanın ayrışması
Nükleer lamina, lamin filamanlarının örgüsünden oluşur. Mitozda, Cdc2 ve diğer protein kinazlar laminleri fosforilleyerek, filamanların serbest lamin dimerlerine ayrışmasına neden olur.



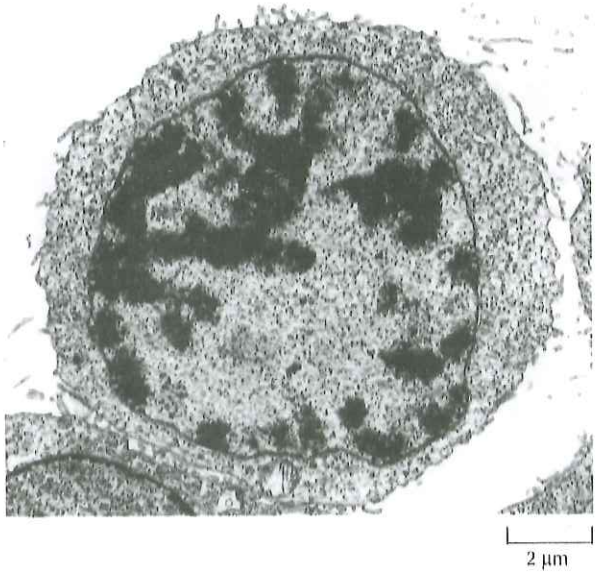
Şekil 8.32 Nükleus zarının yıkılması
Nükleer lamina dağılınca, nükleus zarı parçalanarak vezikülleri oluşturur. B-tipi lamin bu veziküllere bağlı kalırken, lamin A ve C serbest dimerler olarak salınır.



Kromozom Yoğunlaşması

Mitoz sırasında nükleus yapısındaki diğer önemli değişiklik, kromozom yoğunlaşmasıdır. Nükleozomlara paketlenmiş olan interfaz kromatini, yaklaşık bin kez katlanarak, mitoz sürecindeki hücrelerde görülen yoğunlaşmış kromozomları oluşturur (Şekil 8.33). Bu yoğunlaşma, kromozomların yavru hücrelere geçerken, mitoz iğinde birbirine dolanmadan ve kırılmadan hareket etmeleri için gereklidir. Bu yüksek düzeyde yoğunlaşmış DNA'nın transkripsiyonu yapılamaz ve buna bağlı olarak, mitoz sürecinde tüm RNA sentezi durur. Kromozomlar yoğunlaşıp, transkripsiyon durunca nükleolus kaybolur.

Şekil 8.33 Kromozom yoğunlaşması
Mitozun profaz evresinde her bir kromozomun yoğunlaşmasını gösteren elektron mikroskop görüntüsü. (K. G. Murti/Visuals Unlimited.)



Metafaz kromozomundaki yoğunlaşmış DNA, bir yapı iskelesi (scaffold) proteinine tutunan, yüz kilo bazlık DNA'lardan oluşan geniş ilmikler şeklinde düzenlenmiştir (bkz. Şekil 4.16). Mitoz sırasında kromozomun yoğunlaşması, temel öneme sahip olmasına karşın tam olarak anlaşılamamıştır. Kromatinin temel birimi, 146 baz çifti uzunlukta DNA'nın, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarından ikişer tanesinin oluşturduğu histon çekirdeğine dolanmasıyla oluşan nükleozomdur (bkz. Şekil 4.12). Bir histon H1 molekülü, nükleozom çekirdek partikülüne giren DNA'ya bağlanır ve H1 molekülleri arasındaki etkileşim, kromatinin daha yoğun yapıya, üst düzey katlanmasında rol oynar. Histon H1, Cdc2 protein kinazın bir substratıdır ve çoğu hücrede, mitoz sırasında fosforillenir ve bu fosforillenme mitotik

kromozom yoğunlaşmasında rol oynar. Bununla birlikte, son çalışmalar histon H1'in fosforillenmesinin kromozom yoğunlaşmasında gerekli olmadığını göstermiştir ve H1'in fosforillenmesinin rolünün ne olduğu anlaşılamamıştır. Bunun aksine, H3 histonun fosforilasyonunun mitotik kromozomun yoğunlaşması için gerekli olduğu anlaşılmış, ancak, H3'ün fosforillenmesinin kromozom yoğunlaşmasını nasıl etkilediği çözümlenmemiştir.

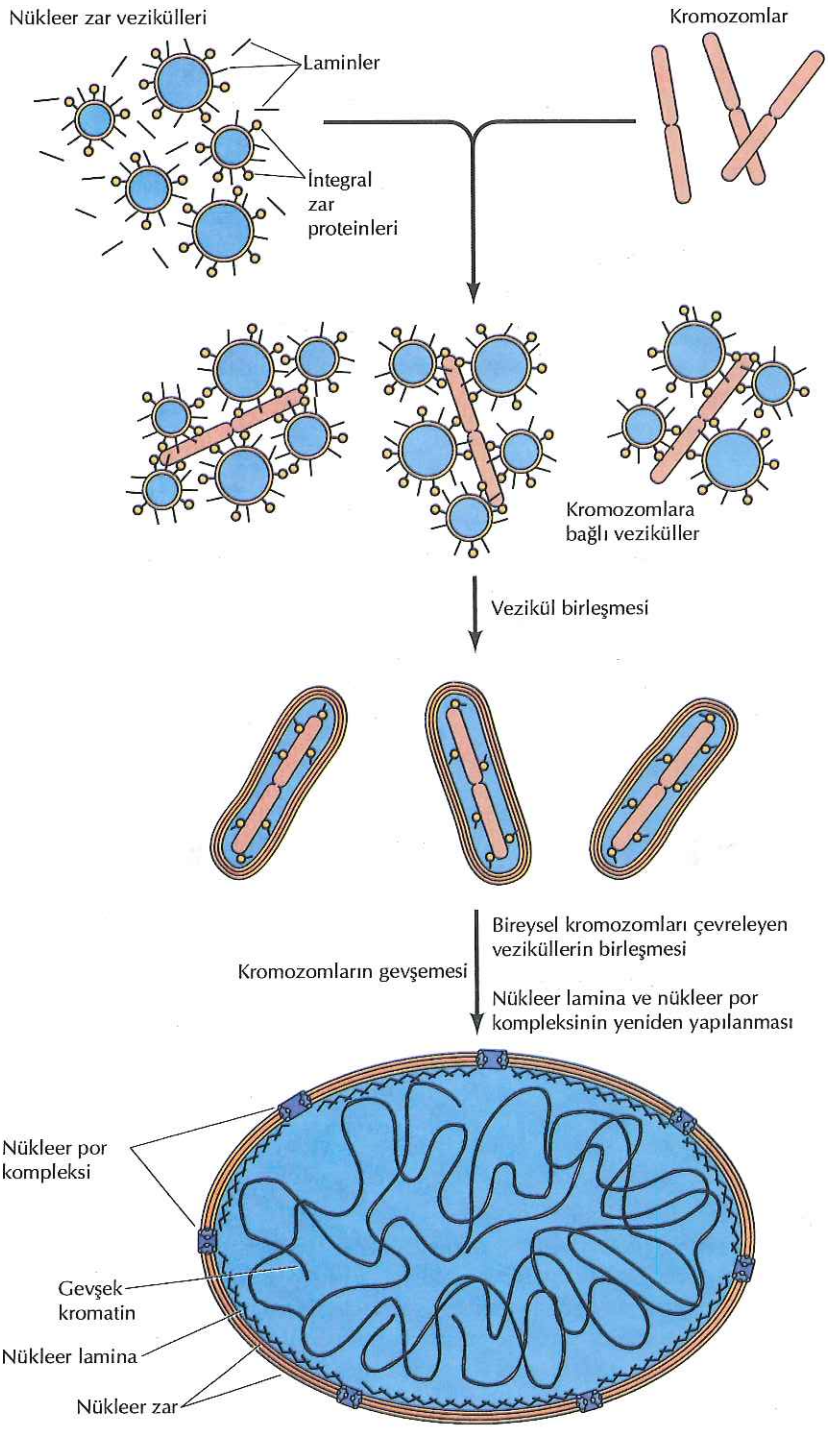
Yakın zamanda yapılmış araştırmalar, ökaryotlarda iyi korunmuş olan, kondensinler adı verilen beş proteinin oluşturdu bir kompleksi tanımladı. Bu kompleks, geniş "kromozomun yapısal koruyucusu" (SMC) proteinler sınıfından iki yapısal alt birimden ve üç düzenleyici alt birimden oluşur. Bu kompleks, interfaz kromozomunun organizasyonunda rol oynadığı gibi, mitoz sırasında kromozomun daha da yoğunlaşmasında etkendir. Bazı düzenleyici alt birimler, aralarında Cdc2 kinazın da yer aldığı kinazlar tarafından fosforillenir ve bu, mitozda kromozom yoğunluğunun değişmesiyle bağlantılıdır. Kohesin olarak adlandırılan benzer bir kompleksin, metafazda kardeş kromatidlerin çiftler oluşturmasında rol oynaması ilginçtir.

İnterfaz Nükleusunun Yeniden Oluşması

Mitozun tamamlanması (telofaz) sırasında, ayrılmış yavru kromozom setlerinin çevresinde yeni nükleuslar şekillenir (bkz. Şekil 8.29). Kromozomun yoğunluğunu kaybetmesi ve nükleer zarfın yeniden yapılanması sinyalini, laminlerinde aralarında yer aldığı hücresel hedef proteinlerin fosforilasyonu ile mitozu başlatan Cdc2'nin inaktifleşmesini sağlar. Metafazdan anafaza ilerleme, siklin B alt birimini yıkarak Cdc2'yi inaktive eden ubikütin- aracılıklı protein yıkım sisteminin aktifleşmesini gerektirir (bkz. Şekil 7.40). Cdc2'nin inaktifleşmesi, mitozun başlangıcında fosfatlanan proteinlerden fosfatın uzaklaşmasına yol açar, sonuçta mitozdan çıkış ve interfaz nükleuslarının yeniden oluşumu gerçekleşir.

Nükleus zarfının yeniden oluşmasında ilk aşama, nükleus zarının yıkımında oluşan veziküllerin kromozomların yüzeyine tutunmalarıdır (Şekil 8.34). Zar veziküllerinin kromozomlarla etkileşimi, laminler ve nükleus iç zarının yapısal proteinleriyle kolaylaştırılmaktadır. Veziküller daha sonra, kromozomların etrafında çift zar oluşturmak üzere birleşirler. Bunu, nükleer por komplekslerinin yeniden yapılanması, nükleer laminanın yeniden şekillenmesi ve kromozom gevşemesi izler. Veziküller önce, her bir kromozomun etrafında zar oluşturmak üzere birleşir, daha sonra bu zarlar birleşerek tek bir tam nükleus oluştururlar.

Nükleer zarfın, başlangıçta yoğun kromozomların çevresinde oluşumu, yeni yapılanan nükleustan sitoplazmaya ait moleküllerin dışlanmasını sağlar.Yeni çekirdek sitoplazmadan nükleer proteinleri seçip içeri alarak genişler. Nükleer yerleşim sinyali proteinlerden uzaklaştırılmadığı için, mitoz başlangıcında nükleus zarfının yıkılmasıyla sitoplazmaya yayılan nükleer proteinler, yeniden oluşan nükleusa geri alınırlar. Ran proteini, nükleus yeniden oluşumunun erken aşamalarının bir çoğunda işlevseldir. Kromozomun yoğun yapısının çözülmesi ve rRNA genlerinin transkripsiyonun başlamasıyla nükleolus da yeniden oluşur ve böylece, mitozun tamamlanması ve interfaz nükleusuna geri dönüş tamamlanır.



Şekil 8.34 Nükleus zarfının yeniden oluşumu
Nükleus zarfının yeniden yapılanmasının ilk basamağı, zar veziküllerinin kromozomlara bağlanmasıdır ki, bu olay integral zar proteinleri ve B-tipi laminler aracılığıyla gerçekleşir. Daha sonra veziküller kaynaşır, nükleer lamina yeniden kurulur ve kromozomlar yoğunluğunu kaybeder.

ÖZET

NÜKLEUS ZARFI VE NÜKLEUS İLE SİTOPLAZMA ARASINDAKİ TRAFİK

Nükleus Zarfının Yapısı: Ökaryot hücrelerinde nükleus zarfı, nükleus bileşenlerini sitoplazmadan ayırır, nükleusu genetik maddeye ev sahipliği yapan biyokimyasal kompartıman olarak korur, transkripsiyonun gerçekleşme ve RNA işlenme yerini belirler. Nükleus zarfı birbiriyle nükleer por kompleksinde birleşen, iç ve dış zarlarla bunların altında yer alan çekirdek laminasından oluşur.

nükleer zarf, nükleer zar, nükleer lamina, lamin

Nükleer Por Kompleksi: Nükleer por kompleksleri, moleküllerin sitoplazma ile nükleus arasında gidip geldikleri yegane yol olan, büyük yapılardır. Küçük moleküller açık por komplekslerinden serbestçe geçebilir. Makromoleküller, enerji gerektiren bir süreçle, seçilerek taşınır.

nükleer por kompleksi

Proteinlerin Nükleusa ve Nükleustan Seçili Taşınımı: Nükleusa alınması planlanan proteinler, reseptörler tarafından tanınan nükleusa yerleşim sinyali içerirler ve por kompleksi içerisinden geçirilirler. Nükleus ile sitoplazma arasında mekik dokuyan proteinler, kendilerini nükleustan sitoplazmaya hedefleyen, nükleustan çıkış sinyalleri içerirler. Genellikle, nükleer por kompleksinden geçiş için, küçük, GTP bağlayan ve geçişin yönünü de belirleyen protein olan, Ran gerekir.

nükleusa yerleşim sinyali, Ran, karyoferin, importin, eksportin, nükleer çıkış sinyali

Nükleer Protein Alımının Düzenlenmesi: Transkripsiyon faktörleri gibi bazı proteinlerin aktiviteleri, nükleusa giriş çıkışlarının düzenlenmesi ile denetlenir.

RNA'ların Taşınması: RNA'lar, nükleer por komplekslerinden ribonükleoprotein kompleksleri halinde taşınırlar. Mesajcı RNA'lar, ribozomal RNA'lar ve taşıyıcı RNA'lar, protein sentezinde görev yapmak üzere nükleustan çıkartılırlar. Çeşitli küçük nükleer RNA tipleri, önce nükleustan sitoplazmaya geçerek bazı proteinlerle birleşir ve RNP'leri oluşturarak nükleusa geri dönerler.

NÜKLEUSUN İÇ DÜZENİ

Kromozomlar ve Kromatin İnce Yapısı: İnterfaz nükleusu transkripsiyon yapmayan, ileri düzeyde yoğun heterokromatin ve gevşek ökromatin içerir. İnterfaz kromozomları nükleus içerisinde düzenlenmiş olup, bağımsız birimler olarak işlev gören, büyük ilmik şeklinde bölgelere ayrılmıştır.

heterokromatin, ökromatin

Nükleus İçerisindeki İşlevsel Bölgeler: Bazı nükleus bileşenleri, ayrı nükleus alt yapılarında veya bölgelerinde yerleşiktir.

NÜKLEOLUS

Ribozomal RNA Genleri ve Nükleolus Organizasyonu: Nükleolus ribozomal RNA genleriyle ilişkilidir. rRNA transkripsiyonunun ve rRNA işlenmesinin yapıldığı, ribozomların yapılandığı ve bazı küçük RNA'ların modifiye oldukları bölgedir.

nükleolus, nükleolus oluşturan bölge

ANAHTAR SÖZCÜKLER

küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar)

rRNA'nın Transkripsiyonu ve İşlenmesi: rRNA genlerinin öncül transkripti 45S pre-rRNA'dır, 18S, 5.8S ve 28S rRNA'ları oluşturmak üzere işlenir. pre-rRNA'nın ve diğer küçük RNA'ların işlenmesi, küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) tarafından gerçekleştirilir.

Ribozom Yapılanması: Ribozom alt birimleri, nükleolusda, rRNA'larla ribozomal proteinlerden yapılanır.

MİTOZDA NÜKLEUS

Cdc2

Nükleer Zarfın Dağılması: Mitoza giriş, Cdc2 protein kinaz aktivasyonu ile uyarılır. Çoğu hücrede profaz sonunda nükleer zarf yıkılır. Nükleer laminanın dağılması, laminlerin Cdc2 ve diğer protein kinazlar tarafından fosforillenmesinin sonucudur.

Kromozom Yoğunlaşması: Histon H1 ve H3'ün fosfatlanması mitotik kromozom yoğunlaşması ile ilişkilidir ve uygun kromozom yoğunlaşması için H3 fosforillenmesi gerekir. Kondensin proteinlerinden oluşan bir kompleks Cdc2 tarafından aktiflenir ve kromozom yoğunlaşmasında rol oynar.

İnterfaz Nükleusunun Yeniden Oluşması: Mitoz sonunda Cdc2'nin inaktifleşmesi, nükleer zarfın oluşmasına ve kromozomların gevşemesine yol açar. Nükleer proteinler daha sonra nükleer por komplekslerinden, seçilerek taşınır.

Sorular

1. Transkripsiyonu translasyondan ayıran nükleer zarf, ökaryotların, prokaryotlarda bulunmayan bir işlemle gen ekspresyonunu düzenlemesine olanak sağlar. Ökaryotlara özel olan bu işlemler nelerdir?

2. Laminler nükleer yapı ve işlevde hangi iki görevi üstlenir?

3. Biri 15 kDa, diğeri 100 kDa ve ikisi de, kurbağa yumurtasının nükleusuna alınma sinyalinden yoksun olan iki proteini enjekte ettiğinizde, nükleusa girerler mi?

4. Nükleusa girişin yönünü ne belirler?

5. Gen-denetleyen bir transkripsiyon faktörünün aktivitesinin, nükleusa alımla nasıl düzenleneceğini açıklayınız.

6. Serin biriminden, nükleusa yerleşim sinyalini bozacak şekilde fosforillenerek düzenlenebilen bir transkripsiyon faktörüyle çalışıyorsunuz. Bu serinleri alaninle değiştiren bir mutasyon, transkripsiyon faktörünün hücre altı yerleşimini ve hedef genin ekspresyonunu nasıl etkiler?

7. Normalde nükleus ile sitoplazma arasında mekik dokuyan bir proteinde nükleer çıkış sinyalini etkisizleştiren bir mutasyon, hücre içi dağılımını nasıl etkiler?

8. DNA replikasyonu 200 özgül bölgede ya da replikasyon fabrikalarında gerçekleşmektedir. Bu bölgeleri, kültürdeki memeli hücrelerinde nasıl bulursunuz?

9. Nükleusa yerleşim sinyalleri, ER sinyal peptidazlarına benzer sinyal peptidazlar tarafından kesilmez. Hücre döngüsü süre-cinde nükleusların geçirdiği değişiklikleri göz önüne alarak, nükleer yerleşim sinyallerinin uzaklaştırılmamasına neden belirtin.

10. Siklin-bağımlı protein kinaz Cdc2'nin mitozun başlatılmasındaki rolü nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Nükleer Zarf ve Nükleusla Sitoplazma Arasında Trafik

Akey, C. W. and M. Radermacher. 1993. Architecture of the *Xenopus* nudear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 122:1-19. [P]

Ben-Efraim, I. and L. Gerace. 2001. Gradient of increasing affinity of importin beta tor nucleoporins along the pathway of nudear import. *J. Cell Biol.* 152:411-417. [P]

Chook, Y. M. and G. Blobel. 1999. Structure of the nuclear transport complex karvopherin-2-Ran.GppNHp. *Nature* 399: 230-237. [P]

Chook, Y. M. and G. Blobel. 2001. Karyupherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 703-715. [R]

Cingolani, G. C. Petosa, K. Weis and C. W. Muller. 1999. Structure of importin-β bound to the IBB domain of importin-α. *Nature* 399: 221-229. [P]

Daneholt, B. 1997. A look at messenger RNP moving through the nudear pore. *Cell* 88: 585-588. [R]

Gant, T. M. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear assembly *Ann. Rev. Cell Biol.* 13: 669-695. [R]

Gerace, L. and B. Burke. 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:353-374. [R]

Gerace, L. and R. Foisner. 1994. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* 4: 127-131, [R]

Goldman, R. D., Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker and T. P. Spann. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16: 533-547. [R]

Ohno, M., M. Fornerod and I. W. Mattaj. 1998. Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell* 92:327-336. [R]

Ryan, K. J. and S. R. Wente 2000. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:361-371. [R]

Ullman, K. S., M. A. Powers and D. J. Forbes. 1997. Nuclear export receptors: From importin to exportin. *Cell* 90:967-970. [R]

Vandromme, M., C. Gauthier-Rouviere, N. Lamb and A. Fernandez. 1996. Regulation of transcription factor localization: Finetuning of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 21:59-64. [R]

Vetter, I. R., A. Arndt, U. Kutay, D. Gorlich and A. Wittinghofer. 1999. Structural view of the Ran-importin β interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 67: 635-646. [P]

Weis, K. 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:328-335. [R]

Nükleusun İç Düzeni

Gall, J. G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 273-300. [R]

Gilson, E., T. Laroche and S. M. Gasser. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* 3:128-134. [R]

Hozak, P. and P. R. Cook. 1994. Replication factories. *Trends Cell Biol.* 4: 48-49. [R]

Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280:547-553. [R]

Manuelidis, L. 1990. A view of interphase chromosomes. *Science* 250: 1533-1540. [R]

Matera, A. G. 1999. Nuclear bodies: Multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9: 302-309. [R]

Mathog, D., M. Hochstrasser, Y. Gruenbaum, H. Saumweber and J. Sedat. 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* 308: 414-421. [P]

Misteli, T., J. F. Caceres and D. L. Spector. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387: 523-527. [P]

Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol.* 7:135-138. [R]

Worman, H. J. and J. C. Courvalin. 2002. The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol.* 12: 591-598. [R]

Nükleolus

Fatica, A. and D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 313-318. [R]

Grosshans, H., K. Deinert, E. Hurt and G. Simos. 2001. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J. Cell Biol.* 153: 745-762. [P]

Johnson, A. W., E. Lund and J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* 27: 580-585. [R]

Kiss, T. 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109:145-148. [R]

Miller, O. L., Jr. and B. Beatty. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* 164: 955-957. [P]

Olson, M. O., K. Hingorani and A. Szebeni. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219: 199-266. [R]

Mitoz Sürecinde Nükleus

Eide, T, C. Carlson, K. A. Tasken,T. Hirano, K. Tasken and P. Collas. 2002. Distinct but overlapping domains of AKAP95 are implicated in chromosome condensation and condensin targeting. *EMBO Rep.* 3:426-432. [P]

Gant, T. M. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 13: 669-695. [R]

Heald, R. and F. McKeon. 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61:579-589. [P]

Kimura, K., M. Hirano, R. Kobayashi and T. Hirano. 1998. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 *in vitro*. *Science* 282: 487-490. [P]

Koshland, D. and A. Strunnikov. 1996. Mitotic chromosome condensation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 12: 305-333. [R]

Marshall, I. C. B. and K. L. Wilson. 1997. Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol.* 7:69-74. [R]

Murray, A. and T. Hunt. 1993. *The Cell Cycle: An Introduction.* New York: W. H. Freeman.

Murray, A. W. 1998. How to compact DNA. *Science* 282:425-427. [R]

Peter, M., J. Nakagawa, M. Doreé, J. C. Labbé and E. A. Nigg. 1990. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602. [P]

Uhlmann, F. 2001. Chromosome condensation: packaging the genome. *Curr. Biol.* 11: R384-R387. [R]

Ward, G. E. and M. W. Kirschner. 1990. Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 61: 561-577.[F]

Wei, Y, L. Yu, J. Brovvn, M. A. Gorovsky and C. D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97: 99-109. [P]

Bölüm 9

Protein Sınıflanması ve Taşınması

Endoplazmik Retikulum, Golgi Aygıtı ve Lizozomlar

Endoplazmik Retikulum 355

Golgi Aygıtı 374

Veziküller Taşınma Mekanizması 382

Lizozomlar 389

ANAHTAR DENEY:
Sinyal Hipotezi 360

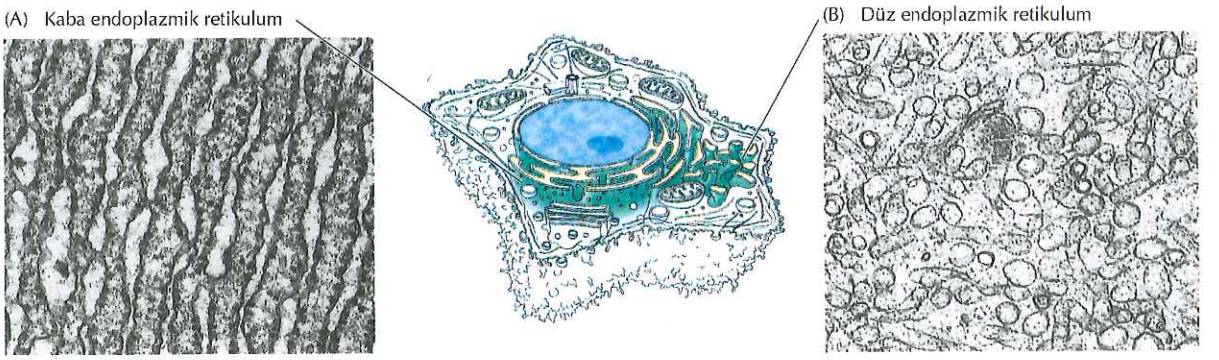
MOLEKÜLER TIP: Gaucher Hastalığı 392

ÖKARYOT HÜCRELER, PROKARYOT HÜCRELERDEN, bir çekirdeğin varlığına ek olarak zarla çevrili organellerinin bulunması ile de ayrılır. Bu organeller, farklı hücresel işlevlerin sürdürüldüğü özel bölmelerin oluşumunu sağlar. Sitoplazmanın işlevsel olarak bölünmesi, ökaryot hücrelerin büyük boyutlarına rağmen (bir bakteri hacminin yaklaşık bin katı) verimli çalışmasını olanaklı kılar.

Ökaryot hücrelerin karmaşık iç organizasyonları göz önüne alındığında, proteinlerin sınıflandırılması ve doğru hedeflere taşınması oldukça önemli görevlerdir. Protein sınıflanmasının ilk basamağı sentezi sırasında gerçekleşir. Endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar ve plazma zarına hedeflenen veya salgılanacak olan pek çok protein, endoplazmik retikulum zarına bağlı ribozomlarda sentezlenir. Translasyon sürerken, sentezlenen polipeptid zincirleri, protein katlanması ve işlemlenmesi için endoplazmik retikulum içine geçer. Endoplazmik retikulumdan, veziküller (kesecikler) aracılığı ile Golgi aygıtına taşınırlar ve burada işlenerek; lizozoma aktarılmak, plazma zarına iletilmek veya salgılanmak üzere sınıflanırlar. Hücre dışından alınan proteinlerin sınıflanma ve iletimlerinde de, endozomlar ile birlikte, bu organellerin bazıları katkıda bulunur (bkz. Bölüm 12). Protein işlemlenmesi ve veziküler taşınmadaki rolleri nedeniyle, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, endozom ve lizozomlar diğer sitoplazmik organellerden ayrılırlar.

Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER) nükleer zardan sitoplazma içine uzanan, zarla çevrili boru ve keselerden (sarnıç) oluşmuş bir ağ yapısıdır (Şekil 9.1). Tüm endoplazmik retikulum, kesintisiz bir zar yapısıyla çevrelenmiştir ve çoğu ökaryot hücrede en büyük organeldir. Zarı tüm hücresel zarların yarısını oluşturur, iç hacmi (lümen veya sarnıç alanı) toplam hücre hacminin yaklaşık %10'unu temsil eder. Aşağıda tartışılacağı gibi, ER'da, hücre içerisinde farklı işlevlere sahip üç kesintisiz zar alanı bulunur. Dış yüzeyi ribozomlarla kaplı **kaba ER**



Şekil 9.1 Endoplazmik retikulum (ER)
(A) Sıçan karaciğer hücrelerinde kaba ER'un elektron mikroskop fotoğrafı. Ribozomlar ER zarının sitoplazmik yüzeyine tutunmuş. (B) Steroid hormon sentezinde aktif olan, testis Leydig hücrelerinde düz ER'un elektron mikroskop fotoğrafı (A, Richard Rodewald, Virginia University/ Biological Photo Service; Don Fawcett, Photo Researchers Inc.)

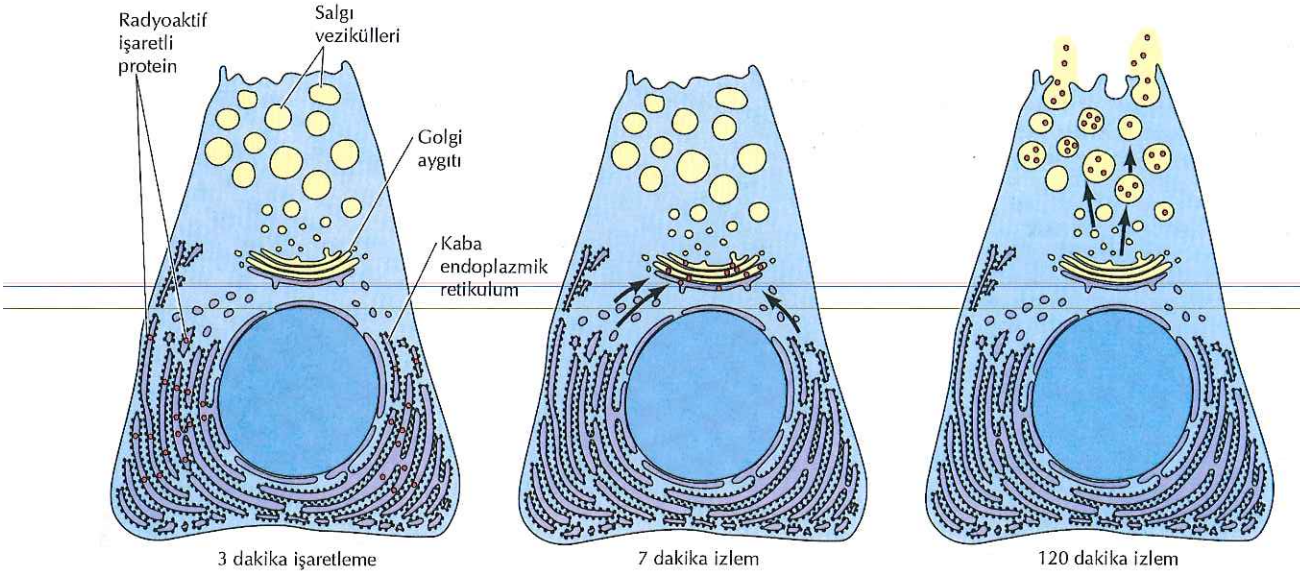
ve veziküllerin Golgi aygıtına gitmek üzere ayrıldığı **transisyonel ER,** protein işlemlenmesinde rol oynarlar. **Düz ER**'un ise ribozomlarla ilişkisi yoktur ve diğerleri gibi protein değil, lipid metabolizmasında görev alır.

Endoplazmik Retikulum ve Protein Salgılanması

Endoplazmik retikulumun protein işlenmesi ve sınıflanmasındaki rolü ilk olarak 1960'larda George Palade ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Şekil 9.2). Bu araştırıcılar ince barsağa sindirim enzimleri salgılayan pankreasın özgülleşmiş hücrelerinde (pankreas asiner hücreleri), yeni sentezlenen proteinlerin yazgısını araştırdılar. Bu hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin çoğu salgılandığından, Palade ve arkadaşları yeni sentezlenen proteinleri radyoaktif amino asitler ile işaretleyerek, salgılanacak proteinlerin hücre içinde izledikleri yolu inceleyebildiler. Radyoaktif işaretli proteinlerin hücre içi yerleşimleri oto-radyografi ile gösterilerek protein salgılanmasında rol oynayan hücresel bölgeler ortaya çıkarılabildi. Pankreas asinar hücrelerinin, radyoaktif amino asitlerle karşılaştırılmasından kısa bir süre sonra, yeni sentezlenen proteinlerin kaba ER'da saptanması, bu bölgenin, salgılanacak proteinlerin sentez yeri olarak tanımlanmasını sağladı. Hücreler daha sonra radyoaktif olmayan amino asitleri içeren ortamda bekletildiğinde (iz sürme olarak tanımlanan bir yöntem) radyoaktif işaretli proteinlerin Golgi aygıtına geçtiği gösterilmiş, daha uzun izleme sürecinde de, işaretli proteinler Golgi'den hücre zar yüzeyine, zar kaynaşması yoluyla içeriklerini hücre dışına aktaran **salgı vezikülleri** aracılığıyla taşınmıştır.

Bu deneyler ile salgılanan proteinlerin izledikleri yol tanımlanmış oldu, **salgı yolağı**: kaba ER→Golgi→salgı vezikülleri→hücre dışı. İleri çalışmalar bu deney sonuçlarını detaylandırmış ve bu yolağın sadece salgılanacak proteinler ile sınırlı olmadığını göstermiştir. Bu yolağın belli bölümleri başka bölmelere hedeflenmiş proteinler tarafından da kullanılmaktadır. Plazma zarı ve lizozom proteinleri de, kaba ER'dan Golgi'ye, oradan da son hedeflerine iletilirler. Yine diğer bazı proteinler, salgı yolunun ilk basamaklarını geçtikten sonra, işlev görecekleri ER veya Golgi aygıtında tutulurlar.

Sonuç olarak proteinlerin ER'a girmeleri, ökaryot hücrelerde protein trafiğinin önemli bir ayrışım noktasıdır. Salgılanacak veya ER, Golgi aygıtı, lizozomlar ve plazma zarına hedeflenen ya da, bu organellerin yapısına katılacak proteinler, öncelikle ER'a hedeflenir.



Şekil 9.2 Salgı yolağı
Yeni sentezledikleri proteinlerin büyük bölümünü salgılayan pankreas asinar hücreleri, proteinlerin hücre içi trafiğini incelemek amacıyla radyoaktif amino asitler ile muamele edildi. Radyoaktif amino asitler ile kısa bir bekletmeden (3 dakika) sonra, yeni sentezlenen proteinlerin kaba ER'a geçmiş olduğu otoradyografi ile gösterildi. Radyoaktif olmayan amino asitler ile bekletmeyi takiben (iz sürme), proteinlerin ER'dan Golgi aygıtına taşındığı, daha sonra da salgı vezikülleri aracılığıyla plazma zarına ve hücre dışına hareket ettiği görüldü.

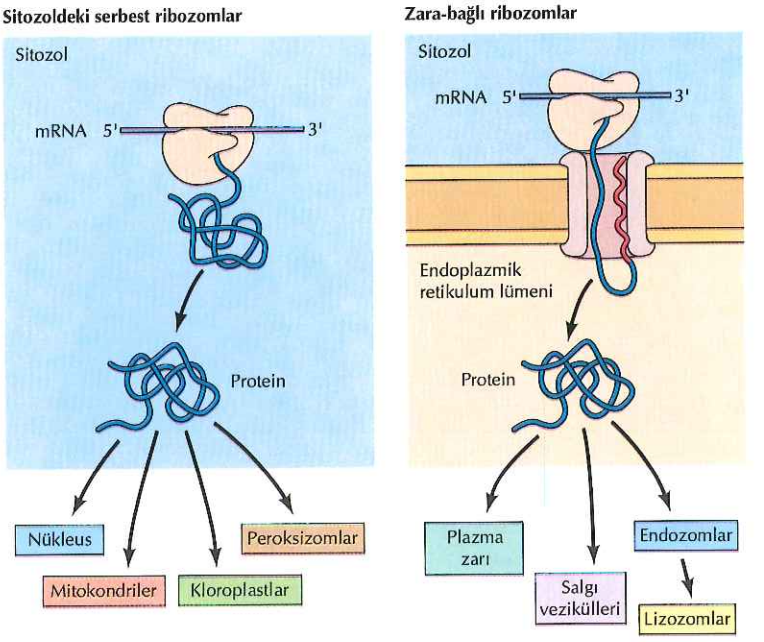
Memeli hücrelerinde, çoğu protein zara bağlı ribozomlar üzerinde sentezlenirken, ER içine geçerler (Şekil 9.3). Buna karşın sitoplazma içinde serbest kalacak veya mitokondri, kloroplast, peroksizom yapısına katılacak proteinler serbest ribozomlarda sentezlenir ve proteine çevrim bittiğinde sitoplazma içine bırakılırlar.

Proteinlerin Endoplazmik Retikuluma Hedeflenmesi

Proteinler, ER'a bağlı ribozomlar üzerinde sentezleri sürerken ER içine geçebildikleri gibi (translasyon-sırasında-yer değiştirme), sitozoldeki serbest ribozomlar üzerinde sentez tamamlandıktan sonra da ER içine alınabilirler (translasyon-sonrası- yer değiştirme). Memeli hücrelerinde çoğu protein ER'a translasyon-sırasında girerken, mayada hem translasyon-sırasında, hem de translasyon-sonrası yollar kullanılır. Translasyon-sırasında aktarım yolunun ilk basamağı, ribozomların ER'a tutunmasıdır. Serbest ve zara bağlı ribozomlar işlevsel olarak birbirlerinden farksızdır ve protein sentezi her zaman sitozolde serbest olarak bulunan ribozomlardan başlar. Salgılanacak proteinlerin sentezlendiği ribozomlar, uzayan polipeptid zincirinin amino ucunda bulunan **sinyal dizileri** sayesinde ER'a hedeflenirler. Bu sinyal dizileri hidrofobik amino asitlerden oluşan kısa diziler olup, ER lümenine aktarım sırasında polipeptid zincirinden uzaklaştırılırlar.

Proteinlerin hücre içindeki doğru yerleşim bölgelerine hedeflenmelerinde sinyal dizilerinin oynadığı rol, ilk olarak, salgılanan proteinlerin ER içerisine alımı üzerine yapılan deneylerle gösterilmiştir. Bu deneylerde, hücre özütünden yoğunluk-gradient santirfügasyonu ile ayrıştırılan kaba ER *in vitro* koşulda kullanılmıştır (Şekil 9.4). Hücreler parçalanıp çekirdekleri santirfügasyonla uzaklaştırıldığında, ER **mikrozom** adı verilen küçük veziküllere ayrılır. Kaba ER'un oluşturduğu veziküller ribozomlarla kaplı olmaları nedeniyle, düz ER veya diğer zarlardan (örn., plazma zarı) ayrılabilir.

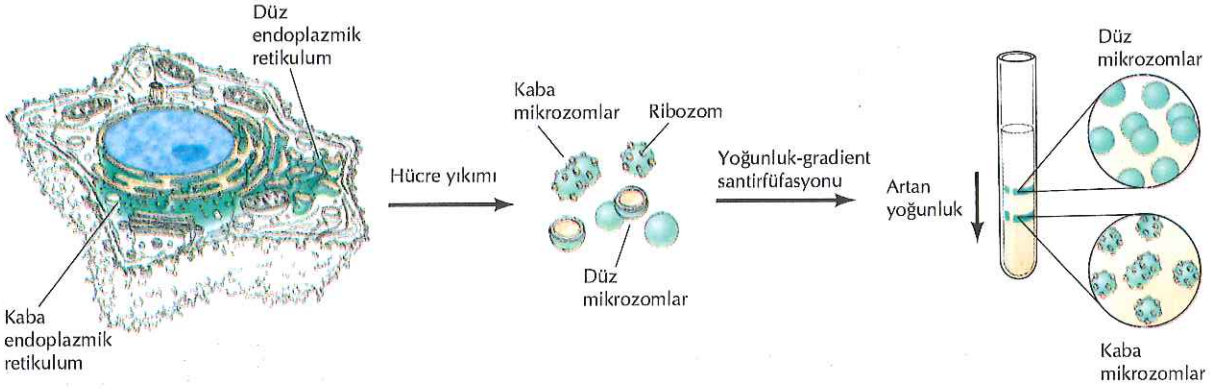
Şekil 9.3 Protein sınıflanmasına genel bakış
Memeli hücrelerinde proteinlerin ER'a ilk ayrımı proteinin sentezi sürerken gerçekleşir. Serbest ribozomlarda sentezlenen proteinler ya sitozolde kalırlar ya da, nükleus, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlara aktarılırlar. Buna karşın, zara bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinler, translasyon sürerken ER içine geçerler. Bu aşamadan sonra, ER'da kalabilir ya da Golgi aygıtına, oradan lizozoma, plazma zarına veya salgı vezikülleri aracılığıyla hücre dışına taşınırlar.

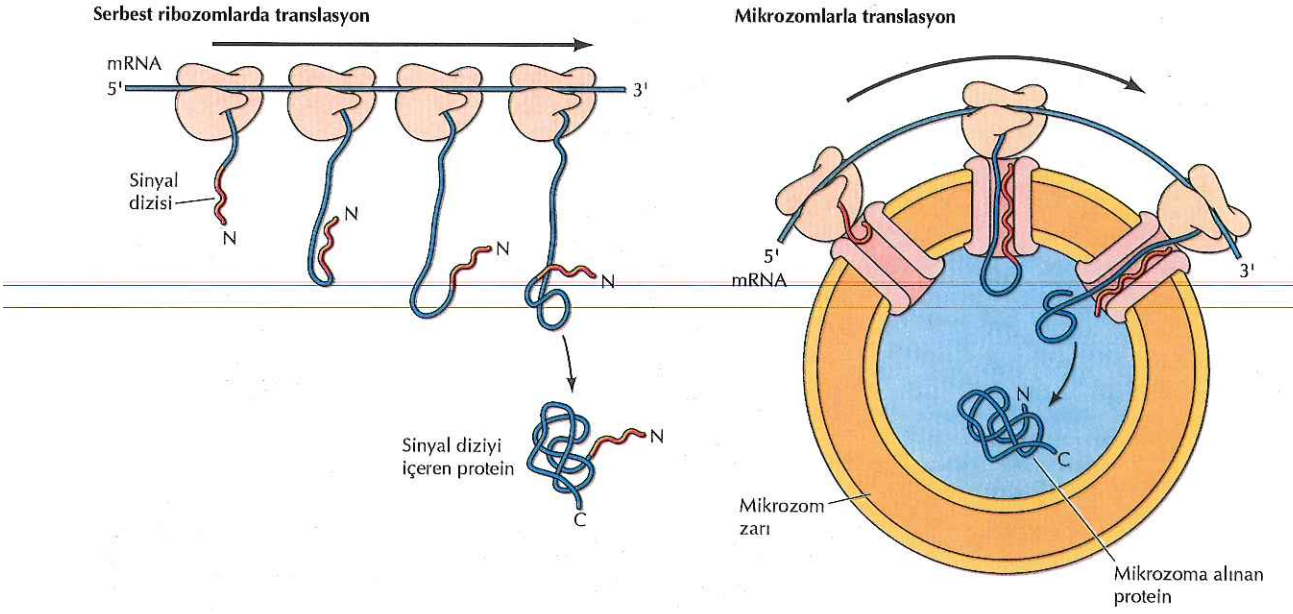


Özellikle, ribozomlarda bulunan büyük miktardaki RNA, tutundukları veziküllerin yoğunluğunu artırırlar. Bu yoğunluk farkı, kaba ER'dan (kaba mikrozomlardan) oluşan veziküllerin, yoğunluk-gradienti santirfügasyonu ile ayrıştırılmasına olanak sağlar.

David Sabatini ve Günter Blobel 1971 yılında ilk olarak, ribozomlardaki ER'a tutunma sinyalinin, sentezlenen polipeptid zincirinin amino ucundaki bir amino asit dizisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu hipotez, immünglobulin gibi salgılanan proteinleri kodlayan mRNA'ların, proteine *in vitro* çevrim sonuçlarıyla desteklenmiştir (Şekil 9.5). Salgılanacak bir proteini kodlayan mRNA'nın, serbest ribozomlar üzerindeki *in vitro* translasyonu sonucunda sentezlenen protein, normal salgılanacak proteinden biraz daha büyüktür. Deney sistemine mikrozomların eklenmesiyle, *in vitro*

Şekil 9.4 Kaba ER izolasyonu
Hücreler parçalandığında, ER mikrozom adı verilen parçalara ayrılır. Kaba ER'dan köken alan mikrozomların (kaba mikrozom) dış yüzeyi ribozomlarla kaplıdır. Ribozomlar büyük miktarlarda RNA içerdiğinden düz mikrozomlardan daha yoğundur ve yoğunluk-gradient santirfügasyonu ile izole edilirler.



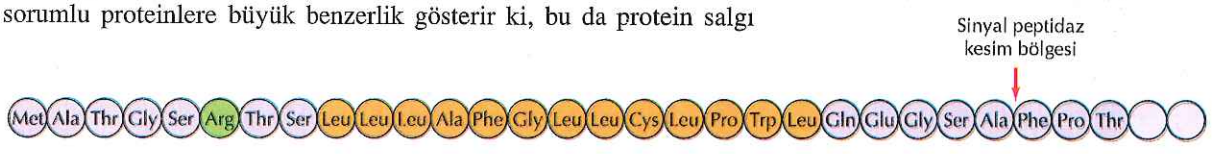


ortamda sentezlenen protein, mikrozom içeriğine katılır ve kesilerek doğru büyüklüğe erişir. Bu deneyler, amino uçtaki öncü dizinin, polipeptid zincirini mikrozomlara hedeflediğini; bu dizinin daha sonra mikrozomal bir proteaz tarafından kesildiğini ileri süren sinyal hipotezinin detaylandırılmasına ön ayak olmuştur. Normalde salgılanmayan bir proteine eklenen sinyal dizisinin, rekombinant proteini ER'a hedefleyip, yapısına katması için yeterli olduğunu gösteren rekombinant DNA deneyleri gibi, daha sonraki çalışmalarda elde edilen yeni veriler de bu hipotezi desteklemiştir.

Salgılanacak proteinleri çevrim- sırasında ER'a hedefleyen mekanizma (translasyon-sırasında yer değiştirme) bugün oldukça iyi bilinmektedir. Sinyal dizisi, yaklaşık 20 amino asit uzunluğundadır, hidrofobik amino asitler içerir ve genellikle polipeptid zincirinin amino ucunda yer alır (Şekil 9.6). Altı polipeptid ve bir küçük sitoplazmik RNA'dan **(srpRNA)** oluşan **sinyal tanıyan partikül (SRP)**, bu sinyal dizilerini, henüz ribozomlarda sentezleri sürerken tanır ve bağlanır. SRP sinyal dizisi ile birlikte ribozoma da bağlanır, proteine çevrimi durdurur ve kaba ER zarında bulunan **SRP reseptörüne** bağlanarak tüm kompleksin (SRP, ribozom, uzayan polipeptid zinciri) ER'a hedeflenmesini sağlar (Şekil 9.7). Reseptöre bağlanma, SRP'nin ribozom ve sinyal dizisinden ayrılmasını sağlar. Bu aşamada ribozom ER zarında bulunan bir protein translokasyon kompleksine bağlanır ve sinyal dizisi bir zar kanalının **-translokon-** içine sokulur. ER'daki translokonlar, hem maya hem de memeli hücrelerinde Sec61 proteinleri adı verilen üç transmembran proteinden oluşmuş komplekslerdir. Maya ve memeli translokon proteinleri, bakteri plazma zarında salgılanan polipeptidlerin translokasyonundan sorumlu proteinlere büyük benzerlik gösterir ki, bu da protein salgı

Şekil 9.5 Salgı proteinlerinin mikrozom yapısına katılımı
Salgı proteinleri, uzayan polipeptid zincirinin ER yapısına katılımı sırasında ayrılan amino (N) terminaldeki bir dizi vasıtasıyla ER'a hedeflenirler. Bu olgu, serbest ribozomlarda sentezlenen salgı proteinlerinin, sinyal dizilerini koruduklarını ve dolayısıyla normalde salgılanan proteinlerden biraz daha büyük olduklarını gösteren deneylerle belirlenmiştir. Bu deney sistemlerine mikrozomlar eklendiğinde, uzayan polipeptid zincirleri mikrozomların yapısına katılmış ve sinyal dizileri proteolitik kesim ile uzaklaştırılmıştır.

Şekil 9.6 Büyüme hormonunun sinyal dizisi
Çoğu sinyal dizisi bazik birimleri (örn., arjinin) izleyen bir dizi hidrofobik amino asit içerir.



ANAHTAR DENEY

Sinyal Hipotezi

Transfer of Proteins Across Membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma

Günter Blobel and Bernhard Dobberstein
Rockefeller University, New York

Journal of Cell Biology, 1975, Volume 67, pages 835-851

Günter Blobel

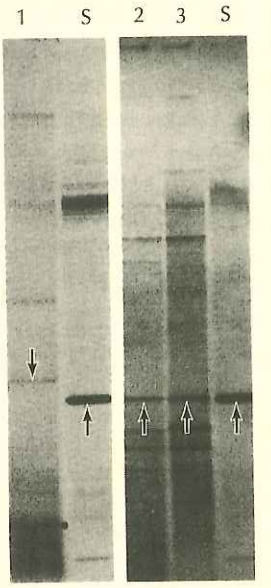
Bağlam

Spesifik polipeptid zincirleri, doğru zarlardan nasıl aktarılır? 1950 ve 1960'lardaki çalışmalar, salgılanan proteinlerin zara bağlı ribozomlarda sentezlendiğini ve sentez sırasında zardan lümen içine transfer edildiğini göstermiştir. Ancak bu bulgular salgılanan proteinlerin sentezlendiği ribozomlar zara bağlanırken, sitozolik proteinlerin sentezlendiği ribozomların neden zara bağlanmadıklarını açıklamamaktadır. Bu farklılığı açıklayacak bir hipotez ilk olarak 1971'de Günter Blobel ve David Sabatini tarafından dile getirilmiştir. O zaman öne sürdükleri hipoteze göre; (1) zara bağlı ribozomlarda okunacak olan mRNA'ların başlama bölgelerinin hemen 3' tarafında, özel bir kodon seti bulunur (2) bu kodonların proteine çevrilmesi, uzayan polipeptid zincirinin amino ucunda özel bir sinyal dizisi oluşturur (3) sinyal dizi polipeptidin zara bağlanmasını tetikler. Blobel ve Dobberstein 1975'de bu fikri destekleyen bir dizi önemli deneyi yayınladılar. Buna ek olarak, sinyal hipotezi adı altında daha önceki hipotezin yeni, daha detaylandırılmış bir versiyonunu ileri sürdüler.

Deneyler

Miyelomlar, B lenfositlerin kanseri olup, aktif olarak immünglobulin salgıladıklarından, salgılanan proteinlerin çalışılması için iyi bir model oluştururlar. Cesar Milstein'in laboratuarında daha önce yapılan çalışmalarda, immünglobulin hafif zincir mRNA'sının *in vitro* translasyon koşullarında sentezledikleri proteinlerin amino ucunda, salgılanan hafif zincirlerde bulunmayan, 20 amino asitlik bir dizinin varlığını gösterdiler. Elde edilen bu veri, bu amino asitlerin, ribozomların zara bağlanmasını yönlendirdikleri öngörüsünün ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu fikri denemek için Blobel ve Dobberstein, miyelom hücrelerinde, zara bağlı ribozomlarda hafif zincirin sentezini incelediler. Önceki çalışmalarda gösterildiği gibi, hafif zincir mRNA'sının serbest ribozomlardaki *in vitro* translasyonu, salgılanan hafif zincir proteinlerinden daha büyük bir protein ile sonuçlanıyordu (şekle bakınız). Buna karşılık, miyelom hücrelerinin zara bağlı ribozomlarındaki mRNA translasyonu sonucu oluşan proteinin, salgılanan hafif zincir ile aynı büyüklükte olduğu görüldü. Buna ek olarak, mikrozomlara bağlı ribozomlarda sentezlenen hafif zincirlerin proteazlara karşı dirençli olduğu izlendi ki, bu da hafif zincirlerin mikrozom içerisine transfer edildiğine işaret etmektedir.

Bu bulgulardan çıkan sonuç, uzayan polipeptid zincirleri, zardan ER lümenine geçerken amino ucu sinyal dizilerinin bir mikrozomal proteaz



İmmünglobulin hafif zincir mRNA'sının serbest ribozomlardaki *in vitro* translasyon ürünü (şerit 1), jel elektroforezinde, salgılanan hafif zincirlerden (şerit S) daha yavaş yürür. Buna karşılık, zara bağlı ribozomlarda *in vitro* sentezlenen hafif zincir (şerit 2), salgılanan hafif zincirler ile aynı büyüklüktedir. Buna ek olarak, zara bağlı ribozomlarda *in vitro* sentezlenen ürünlerin proteaz sindiriminden etkilenmedikleri gözlenmektedir (şerit 3) ki, bu da mikrozom içine geçerek proteazlardan korunduklarını düşündürmektedir.

mekanizmalarının, ökaryot ve prokaryot hücreler arasındaki dikkat çekici korunumunu gösterir. Ribozomun SRP'den translokona aktarılması, baskılanmış olan çevrimin kaldığı yerden devam etmesini sağlar ve uzayan polipeptid zinciri doğrudan translokon kanalı yoluyla

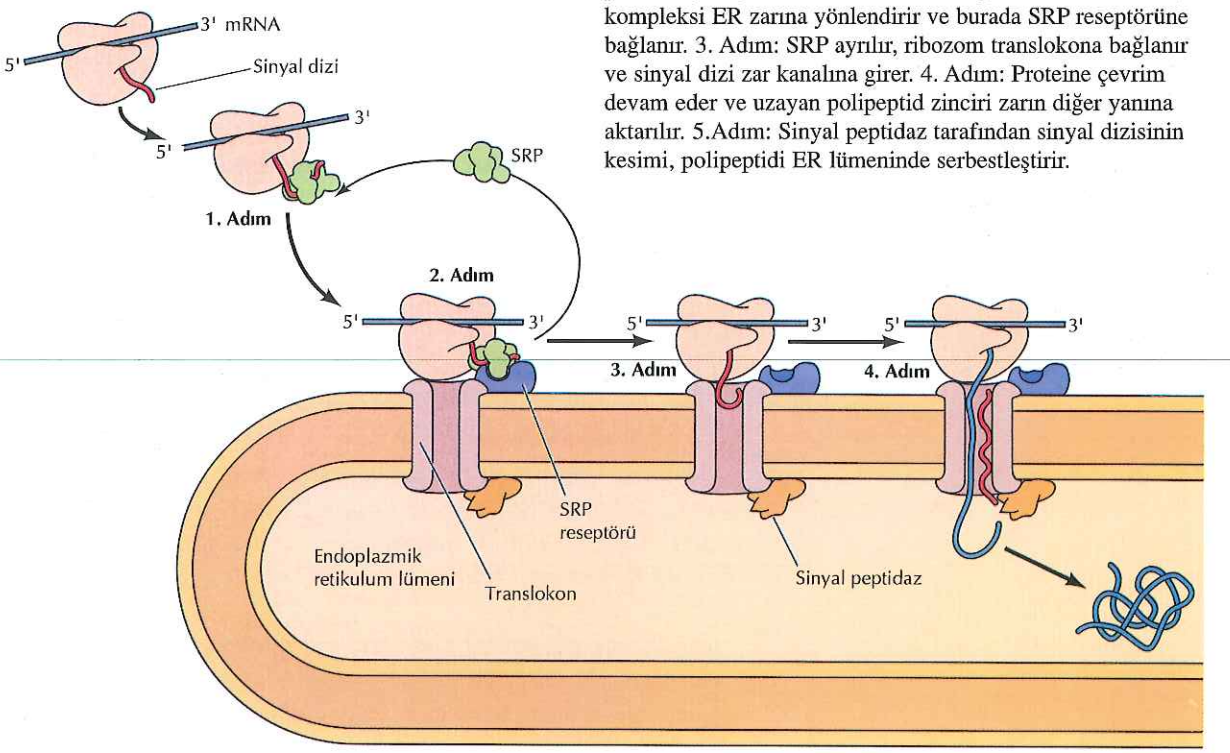
tarafından kesildiği yönündedir. Sonuçlar, sinyal hipotezinin daha detaylandırılmış şekliyle yorumlandı. Blobel ve Dobberstein tarafından belirtildiği gibi "Sinyal hipotezinin temel fikri, translasyon ürünleri bir zardan geçecek olan mRNA'ların başlama kodonlarının hemen sağında, özel bir kodon dizisinin varlığıdır."

Etki

Proteinlerin zarlardan seçici olarak geçişi ökaryot hücrelerde zarla çevrili organellerin devamlılığı açısından önemlidir. Bu organellerin özgüllüklerini korumaları için proteinlerin, özgül olarak, uygun zarlardan geçişi sağlanmalıdır. Sinyal hipotezi bu fenomenin anlaşılmasına temel sağlamıştır. Bu temel model, sadece salgılanan proteinlerin ER içine transferini açıklamakla kalmadı, bunun yanında, genel olarak proteinlerin tüm diğer zarla çevrili bölmelere hedeflenmelerinin açıklanması için de bir çerçeve sağlayarak hücre biyolojisinin tüm alanlarını etkiledi.

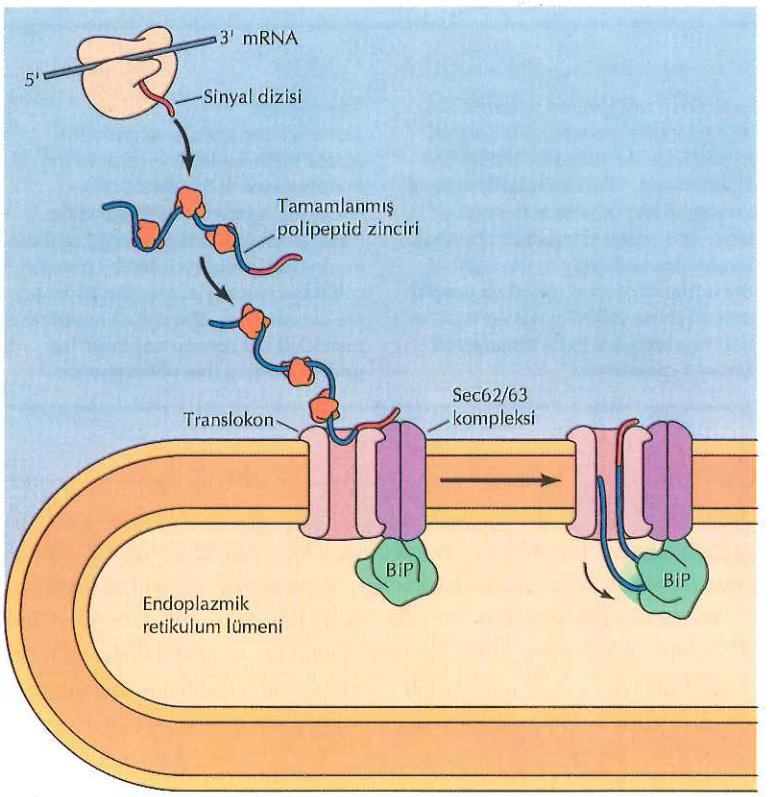
ER zarından iç boşluğa geçer. Diğer bir deyişle, protein sentez sürecinin kendisi polipeptid zincirlerinin translokondan geçişini sağlamaktadır. Translokasyon gerçekleştikçe, sinyal dizisi bir **sinyal peptidaz** enzimi tarafından kesilir ve polipeptid ER lümenine bırakılır.

Mayadaki pek çok protein gibi, memelilerdeki bazı proteinler de, ER zarına bağlı ribozomlar üzerinde sentezleri sürerken değil, protein sentezi tamamlandıktan sonra ER'a hedeflenirler (translasyon-sonrası-yer değiştirme). Bu proteinler sitozoldeki serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve translasyon-sonrasında ER'a aktarılmaları için SRP gerekli değildir. Bunun yerine, polipeptidin sinyal dizileri, ER



Şekil 9.7 Salgı proteinlerinin ER'a translasyon-sırasında hedeflenmesi

1.Adım: Ribozomda sinyal dizi ortaya çıkınca, sinyal tanıyan partikül (SRP) tarafından tanınır ve bağlanır. 2. Adım: SRP, kompleksi ER zarına yönlendirir ve burada SRP reseptörüne bağlanır. 3. Adım: SRP ayrılır, ribozom translokona bağlanır ve sinyal dizi zar kanalına girer. 4. Adım: Proteine çevrim devam eder ve uzayan polipeptid zinciri zarın diğer yanına aktarılır. 5.Adım: Sinyal peptidaz tarafından sinyal dizisinin kesimi, polipeptidi ER lümeninde serbestleştirir.



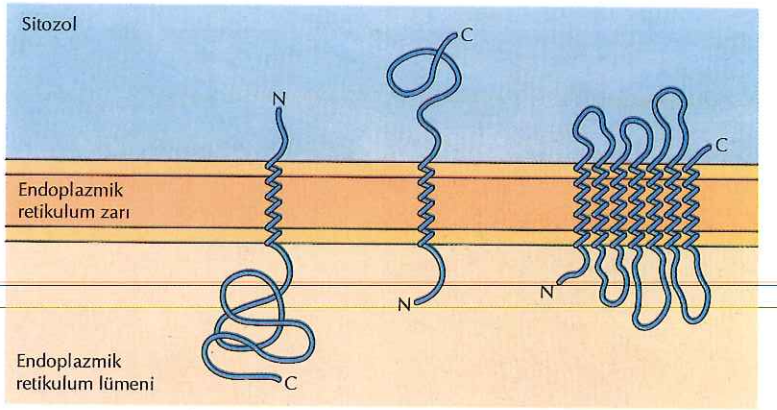
Şekil 9.8 Proteinlerin ER içerisine translasyon-sonrası translokasyonu
ER içerisine translasyon-sonrası alınacak proteinler serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve sitozoldeki şaperonlar tarafından, katlanmamış konformasyonda tutulurlar. Sinyal dizileri, ER zarlarında, translokon ile ilişkide olan Sec62/63 kompleksi tarafından tanınır. Sec63 aynı zamanda proteini ER içerisine çekmek için moleküler bir mandal gibi işlev gören şaperon protein (BiP) ile ilişkidedir.

üzerindeki translokonlarda bulunan farklı reseptör proteinler (Sec62/63 kompleksi) tarafından tanınır (Şekil 9.8). Sitozolde bulunan Hsp70 şaperonları, translokona girebilmeleri için polipeptid zincirlerini katlanmamış konformasyonda tutmak için gereklidir. ER'da bulunan bir başka Hsp70 şaperonu (BiP) da polipeptid zincirini kanaldan ER içine çekmek için gereklidir. Öyle gözüküyor ki, proteinlerin translasyon-sonrası-yer değiştirmelerini sağlamak için polipeptidlerin BiP'e bağlanmaları gerekirken, uzayan polipeptid zincirlerinin translasyon-sırasında translokasyonu doğrudan protein sentez süreci tarafından gerçekleştirilmektedir.

Proteinlerin ER Zarına Katılması

Hücreden salgılanan veya ER lümeni, Golgi aygıtı, endozom veya lizozomlara hedeflenen proteinler yukarıda tarif edilen şekilde ER zarından geçerler ve ER lümeninde serbest kalırlar. Ancak, plazma zarına veya diğer bölmelerin zar yapılarına katılacak olan proteinler, ER lümenine geçmek yerine, ER zar yapısına katılır. Bu aşamadan itibaren, hedef yerlerine salgı proteinleri ile aynı yolu izleyerek giderler: ER → Golgi → plazma zarı veya endozom → lizozom. Ancak bu moleküller, çözünmüş proteinler olarak değil, zar bileşenleri olarak transfer edilirler.

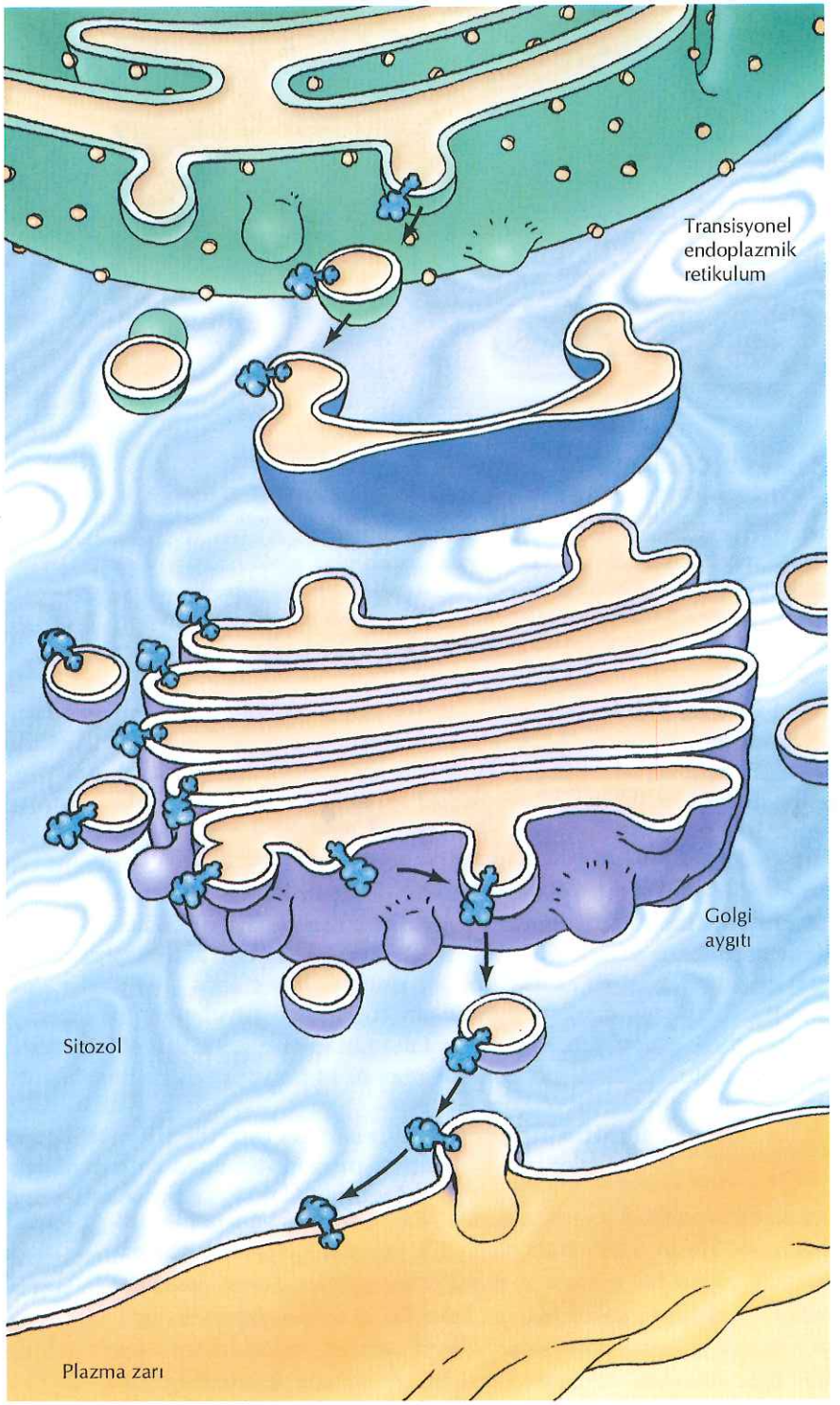
İntegral zar proteinleri, fosfolipid çift-tabakayı boydan boya kat eden, hidrofobik bölgeleri ile zara gömülürler (bkz. Şekil 2.48). Bu proteinlerin zarı geçen bölümleri genellikle 20-25 amino asitten oluşan



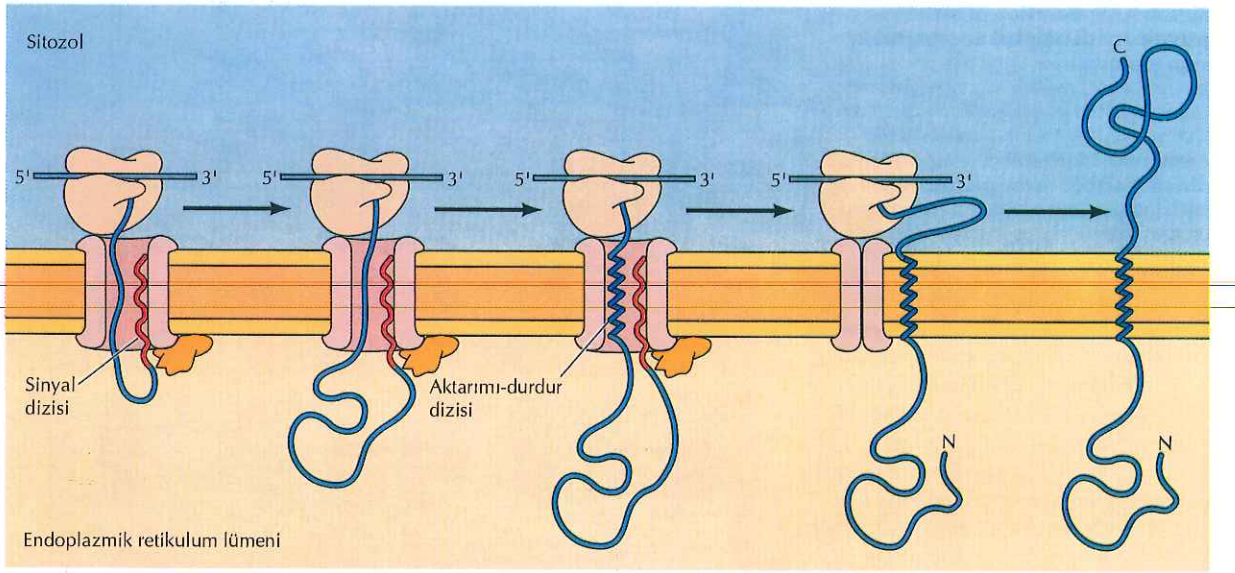
Şekil 9.9 Zar proteinlerinin yönlenimi
İntegral zar proteinleri 20-25 hidrofobik amino asitten oluşan α-sarmal bölgeleriyle zarı kat eder. α–sarmal bölgesi, zara değişik yönlenimle yerleşebilir. Solda ve ortadaki iki protein, zarı sadece bir kez geçmelerine karşın, amino veya karboksil uçlarının sitozol tarafında olmasıyla ayrılırlar. Sağda ise zarı çok kez geçen bir protein örneği bulunmaktadır.

α-sarmal yapısındadır. α-sarmal yapısı peptid bağlar arasındaki hidrojen bağı oluşumunu en üst düzeye çıkarır ve hidrofobik amino asitlerin yan zincirleri, çift tabakadaki yağ asitlerinin kuyruğu ile ilişkiye girer. Ancak değişik integral zar proteinlerinin zara gömülme şekilleri farklıdır (Şekil 9.9). Örneğin bazı integral zar proteinleri zarı bir kez geçerken, diğerlerinin çoklu geçiş bölgeleri bulunabilir. Buna ek olarak, bazı proteinlerin amino uçları sitozolik tarafa bakar, diğerlerinin ise karboksil uçları sitozole dönüktür. Golgi, plazma zarı ve lizozomlardaki bu proteinlerin yönlenimi, uzayan polipeptid zincirinin ER içine aktarım sürecinde belirlenir. ER lümeni topolojik olarak hücre dışına karşılık gelmektedir. Plazma zar proteinlerinin hücre dışına bakan bölümleri, polipeptid zincirinin ER lümenine geçen bölümlerine karşılık gelir (Şekil 9.10).

ER zarına katılımın en kestirme şekli, karboksil uçları sitozole bakan transmembran proteinlerin sentezidir (Şekil 9.11). Bu proteinler, polipeptid zinciri translokon yoluyla ER zarından içeriye aktarılırken kesilen, normal bir amino ucu sinyal dizisi içerirler. Sonra, proteinin ortasında bulunan, ikinci bir, zar kat eden α-sarmal yapısıyla, zara sabitlenirler. Aktarımı-durdur dizisi olarak adlandırılan bu transmembran dizi, translokon kanalının kapanmasını uyarır. Böylece, polipeptid zincirinin zardan daha fazla geçişi durdurulur ve polipeptid zincirinin karboksil ucu sitozolde sentezlenir. Translokon alt birimlerine ayrılır ve proteinin transmembran bölgesi, lipid çift tabakasının içine yerleşir. Transmembran proteinlerinin zar içine gömülmeleri, iki farklı elemanın ardışık etkisi ile gerçekleşir: zar geçişini tetikleyen kesilebilir bir amino ucu sinyal dizisi ve proteini zara sabitleyen bir transmembran, aktarımı-durdur dizisi.



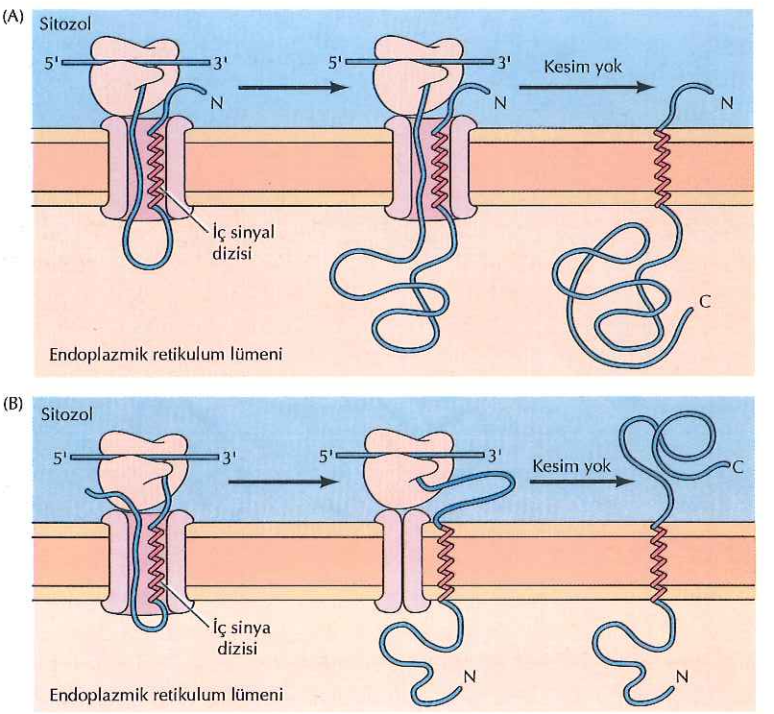
Şekil 9.10 Salgı yolağının topolojisi
Endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtının lümenleri, topolojik olarak, hücre dışına karşılık gelir. Sonuç olarak, polipeptid zincirlerinin ER içine giren kısımları, plazma zarına aktarıldıklarında hücre dışına yerleşecektir.



Şekil 9.11 Kesilebilir bir sinyal dizisi ile, tek bir aktarımı-durdur dizisine sahip bir zar proteinin yerleşmesi
Polipeptid zinciri zarı geçerken sinyal dizisi uzaklaştırılır. Böylece polipeptid zincirinin amino ucu ER lümenine bakar. Ancak polipeptid zincirinin zardan geçişi, translokonu kapatan ve proteini zara sabitlemek üzere, kanaldan yana doğru çıkaran, bir transmembran, aktarımı-durdur dizisi tarafından durdurulur. Translasyonun tamamlanmasıyla, zarı geçen ve karboksil ucu sitozolik yüzde olan bir protein oluşur.

Proteinler ER zarına sinyal peptidaz tarafından parçalanmayan iç sinyal dizileri ile de sabitlenebilir (Şekil 9.12). Bu iç sinyal dizileri, daha önce tartışıldığı gibi, SRP tarafından tanınır ve ER zarına getirilir. Bu sinyal dizileri, sinyal peptidaz tarafından parçalanmadığından, translokondan ayrılan ve proteinleri ER zarına sabitleyen α-heliks olarak davranırlar. Burada önemli bir nokta da, sinyal dizisinin, amino veya karboksil ucun translokondan geçişini sağlayabilecek şekilde yerleşimidir. Bu mekanizmayla sinyal dizisinin yönlenimine bağlı olarak proteinlerin amino veya karboksil uçları sitozol tarafında olabilir.

Bazı proteinlerin zarı çok kez geçmelerinde, ardışık gelen integral sinyal dizilerinin ve aktarımı-durdur dizilerinin etkin olduğu düşünülmektedir. Örneğin bir iç sinyal dizisinin varlığı, amino ucu sitozolik yüze bakan bir polipeptidin zara katılması ile sonuçlanabilir (Şekil 9.13). Bir aktarımı-durdur dizisi varlığında, polipeptid ER lümeninde bir ilmik oluşturur, bu arada protein sentezi zarın sitozolik yüzünde devam eder. İkinci bir sinyal dizisi ile karşılaşılması halinde uzayan polipeptid zinciri bu sefer sitozolik yüzeyde bir başka ilmik oluşturarak tekrar ER'a gömülür. Bunu, başka bir aktarımı-durdur dizisi takip edebilir ve bu süreç böylece devam eder. Bir seri ardışık sinyal ve aktarımı-durdur dizisi, hem lümen tarafında, hem de sitozolik yüzde ilmik yapıları bulunan, zarı çok kez kat eden, proteinlerin oluşumu ile sonuçlanır.

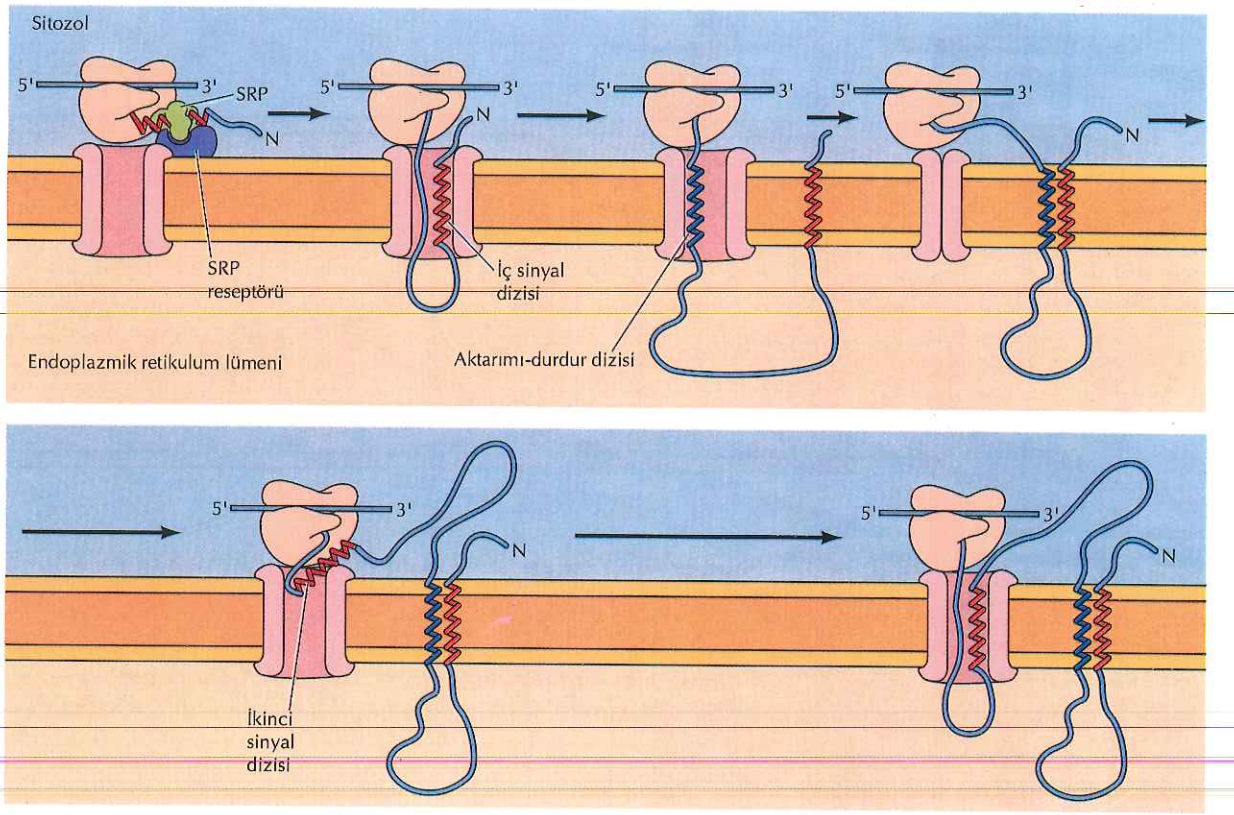


Şekil 9.12 İçinde, uzaklaştırılamayan sinyal dizileri bulunan proteinlerin zara yerleşimi İç yapısında, uzaklaştırılamayan sinyal dizilerinin bulunması, proteinlerin her iki yönlenimde ER zarına yerleşmelerini sağlayabilir. (A) Sinyal dizisi, amino uç sitozol tarafında olacak şekilde, polipeptid zincirinin zara yerleşmesini sağlar. Polipeptid zincirinin geri kalanı, translasyon sürerken ER içerisine geçer. Sinyal dizisi uzaklaştırılmaz, karboksil uç ER lümeninde olacak şekilde, proteini zara sabitleyen bir dizi işlevi görür (B) Diğer, uzaklaştırılamayan iç sinyal dizileri, polipeptidin amino ucunun zardan geçmesini sağlar. Translasyonun devamı, amino ucu lümende, karboksil ucu sitozolde bulunacak şekilde ER zarını geçen bir protein ile sonuçlanır. Bu yerleşim biçiminin, uzaklaştırılabilir sinyal dizisini izleyen bir aktarımı-durdur dizisi taşıyan protein ile aynı olduğuna dikkat ediniz (bkz. Şekil 9.11).

ER'da Protein Katlanma ve İşlemlenmesi

Polipeptid zincirlerinin doğru üç boyutlu yapılarına katlanmaları, polipeptidlerin çoklu alt birime sahip proteinleri oluşturmaları ve protein işlemlenmesi ile ilgili kovalent modifikasyonlar Bölüm 7'de tartışıldı. Salgı yoluna giren proteinler için bu aşamaların çoğu, ER zarından içeriye aktarılırken veya ER lümeninde gerçekleşir. İşlemlenme olaylarından biri sinyal peptidinin, polipeptid zinciri ER zarından geçerken gerçekleşen proteolitik kesimidir. Buna ek olarak ER, protein katlanmasının gerçekleştiği, çoklu alt birime sahip proteinlerde bu alt birimlerin bir araya geldiği, disülfid bağlarının oluştuğu, glikozillenmenin ilk basamaklarının gerçekleştiği ve bazı plazma zar proteinlerine glikolipid çapaların eklendiği yerdir. Hatta, lümendeki ER proteinlerinin birincil işlevi, içeriye yeni alınmış polipeptid zincirlerinin katlanmasında ve protein üst düzey yapısının oluşturulmasında yer almaktır.

Önceden tartışıldığı gibi, proteinler translasyon sürerken katlanmamış polipeptid zincirleri olarak ER zarından lümen içine aktarılır. Bu polipeptidler katlanmayı düzenleyen moleküler şaperonlar yardımıyla üç boyutlu yapılarına ER içinde katlanırlar (bkz. Bölüm 7). Bir Hsp70 şaperonu olan BiP'in, katlanmamış polipeptid zincirine, zarı geçerken bağlandığı ve sonra protein katlanması ile alt birimlerin birleştirilmesini ER içinde düzenlediği düşünülmektedir (Şekil 9.14). Doğru yapılandırılmış proteinler BiP'ten ayrılırken, Golgi aygıtına aktarılmaları için gerekli, diğer şaperonlar ortamda hazır bulunurlar.

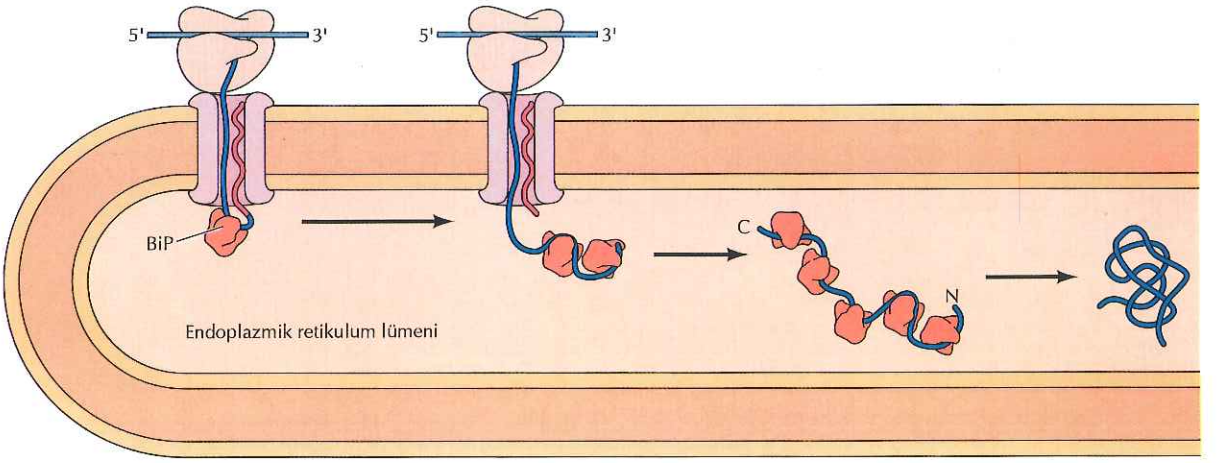


Şekil 9.13 Zarı bir çok kez kat eden bir proteinin zara yerleşimi
Bu örnekte, internal sinyal dizisinin varlığı, polipeptid zincirinin amino ucu zarın sitozol yüzünde olacak şekilde yerleşmesini sağlar. Bir aktarımı-durdur dizisi translokon kanalının kapanmasını uyarır. Bu durum sitozolde translasyon devam ederken, ER içerisinde polipeptid zincirinin bir ilmik oluşturmasına neden olur. İkinci bir internal sinyal dizisi kanalı tekrar açarak polipeptid zincirinin kanala tekrar sokulmasına ve sitozolde bir ilmik oluşumuna yol açar. Bu süreç, zarı geçen çok sayıda bölgesi bulunan proteinlerin zara yerleşimiyle sonuçlanacak şekilde, pek çok kez tekrar edebilir.

Normal olmayan bir şekilde katlanmış veya yanlış yapılandırılmış proteinler, ileride tartışılacak olan, protein yıkımı için hedef oluştururlar.

Sistein birimlerinin yan zincirleri arasında disülfid bağının oluşumu, ER içindeki protein katlanma ve yapılandırılmasının önemli bir unsurudur. Bu bağlar, indirgen bir çevre olan ve sistein amino asitlerini indirgenmiş formda (-SH) tutan sitozolde oluşmaz. ER'daki oksitleyici ortam ise disülfid bağ (S-S) oluşumunu destekler ve ER'da oluşmuş disülfid bağları, salgılanan ve hücre yüzey yapısında bulunan proteinlerin yapısında önemli rol oynar. Disülfid bağ oluşumu ER lümeninde yerleşik **protein disülfid izomeraz** enzimi (bkz. Şekil 7.23) ile gerçekleşir.

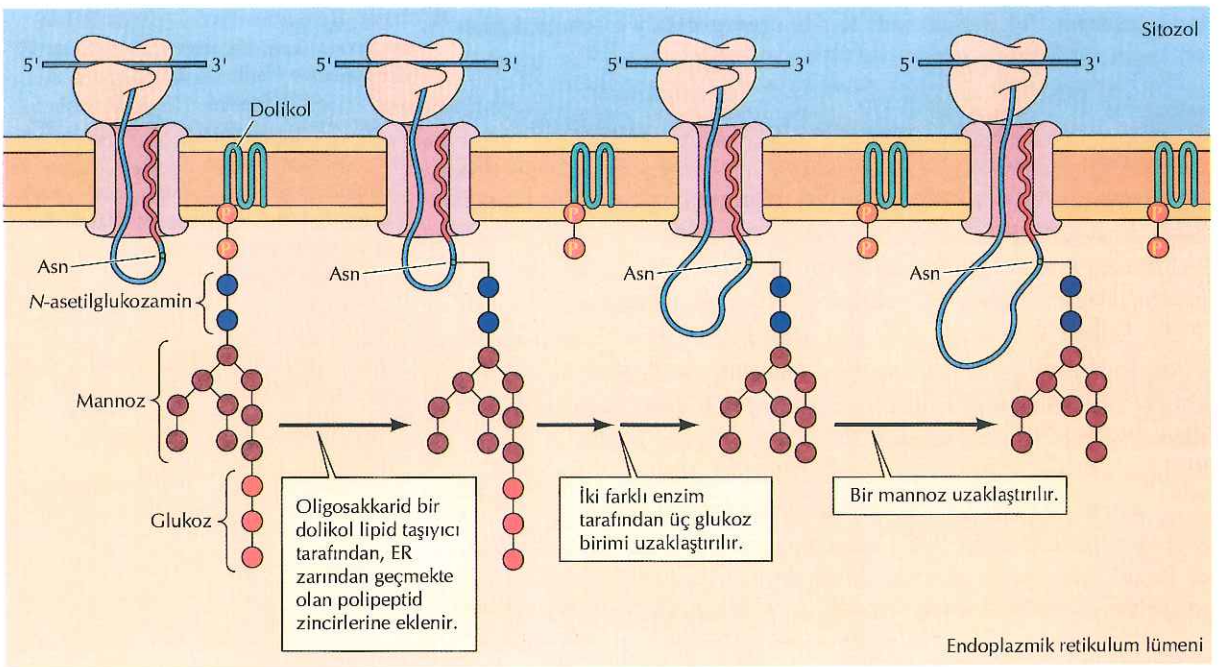
Proteinler ayrıca, translasyonları sürerken, ER içinde, spesifik asparajin birimlerinden glikozillenirler (N-bağlı glikozillenme) (Şekil 9.15). Bölüm 7'de tartışıldığı gibi, uzayan polipeptid zincirleri ER zarından lümene geçerken, asparajin birimlerine, 14 şeker biriminden oluşan oligosakkarid eklenir. Oligosakkarid, ER zarına sabitlenmiş bir lipid (dolikol) taşıyıcı üzerinde sentezlenir. Sonra bir bütün olarak, bağlanacağı Asp-X-Ser / Thr ortak dizisindeki asparajin birimine, zara bağlı bir enzim olan oligosakkarid transferaz tarafından aktarılır. Dört şeker biriminin (3 glukoz ve 1 mannoz), protein henüz ER içindeyken, ayrılması sağlanır ve protein Golgi aygıtına taşındıktan sonra, ileri modifikasyonlar devam eder (ileride bu bölümde tartışılacak).

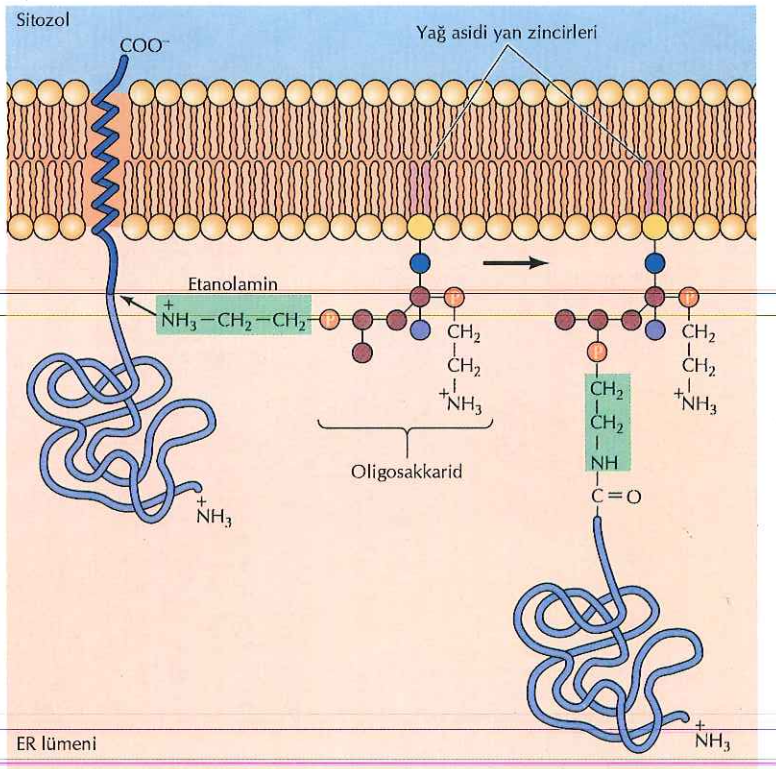


Şekil 9.14 ER içerisinde protein katlanması
Moleküler şaparon BiP, ER zarından geçerken polipeptid zincirine bağlanır ve ER içerisinde protein katlanması ile montajını düzenler.

Bazı proteinler plazma zarına transmembran bölgeleriyle değil, glikolipidler yoluyla sabitlenir (çapalanır). Yapıları Şekil 7.34'de gösterilen, zara "çapa atabilen" glikolipidler, fosfatidilinositol içerdiklerinden **glikosilfosfatidilinositol (GPI) çapaları** olarak adlandırılırlar. GPI çapaları, ER zarı içinde oluşturulurlar. Protein sentezinden hemen sonra, zar kat eden C-ucu bölgeleri ile zara çapalanmış bazı proteinlerin karboksil uçlarına eklenirler. (Şekil 9.16) Proteinin transmembran bölgesi GPI çapası ile değiştirilir. Böylece bu proteinler zara sadece ilgili glikolipidler sayesinde bağlı kalırlar. Transmembran proteinler gibi, hücre yüzeyine, salgı yolağını izleyen

Şekil 9.15 ER içerisinde protein glikozillenmesi





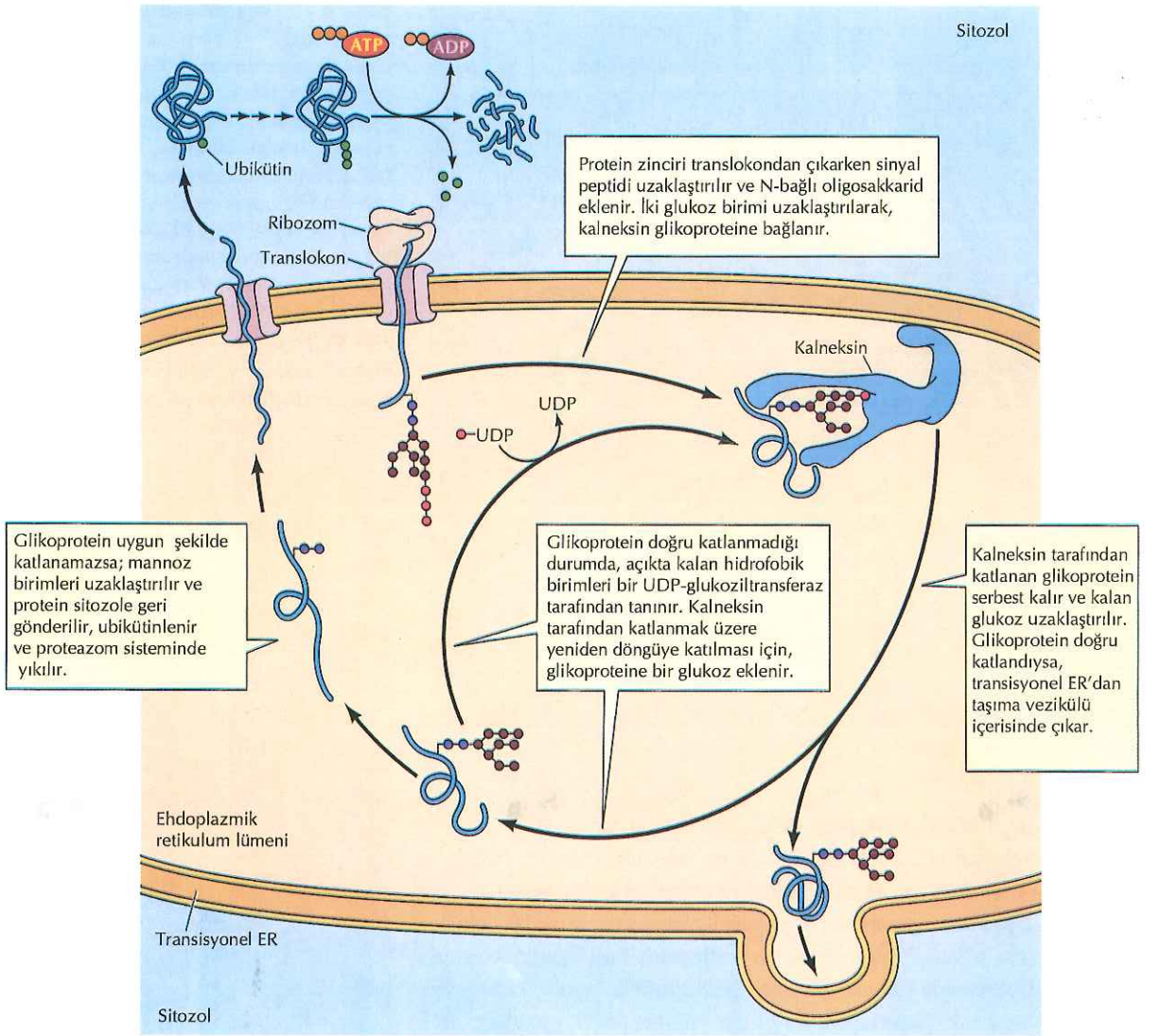
Şekil 9.16 GPI çapalarının eklenmesi
Glikozilfofatidilinositol (GPI) çapaları, iki yağ asidi zinciri, inositol ve diğer şekerlerden oluşun bir oligosakkarid eklentisi ve etanolaminden oluşmuştur (daha detaylı yapı için bkz. 7.34). GPI çapaları ER içinde yapılandırıldıktan sonra, karboksi-ucu-zarı kat eden bölgelerden zara çapalanmış polipeptidlere eklenirler. Zarı geçen bölge uzaklaştırılır ve translasyon biter bitmez yeni karboksil uç, etanolaminin NH_2 grubuna eklenerek proteinin, zara GPI çapası ile bağlanması sağlanır.

zar bileşenleri olarak ulaşırlar. GPI çapası olan proteinlerinin ER içindeki yönlenimleri, hücrenin dış yüzeyine yerleşimlerini belirler, GPI çapası proteinin zar ile olan bağlantısından sorumludur.

ER'da sentezlenen proteinlerin yaklaşık yarısına yakını, 20 dakika içinde yıkıma uğrar. Proteinin doğru katlanamaması bunun başlıca nedenidir. Dolayısıyla ER'ın bir başka önemli rolü de, yanlış katlanmış proteinleri tanımak, işaretlemek ve yıkım yolağına sevk etmektir. ER lümeninde bulunan şaperon ve protein işlemleme enzimleri protein katlanmasında da görev aldıklarından, çoğu kez yanlış katlanmış proteinleri de tanırlar. ER protein kalite kontrolü tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, glikoprotein şaperonlar olan **kalneksin** ve **kalretikulin**in rolü ile ilgili pek çok veri bulunmaktadır (Şekil 9.17). Bu proteinler translokasyon tamamlanmadan, kısmen katlanmış glikoproteinler üzerindeki şeker birimlerine bağlanarak, glikoproteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olurlar. Eğer glikoprotein çoklu denemeler sonrasında doğru katlanmayı başaramazsa, şaperon kompleksi tarafından, translokon kanalından geri-translokasyonunu da kapsayan yıkım yolağına yönlendirilir. Sitozolde ubikütinlenme ile işaretlendikten sonra, Bölüm 7'de tarif edildiği gibi proteazomda yıkıma uğrar.

Düz ER ve Lipid Sentezi

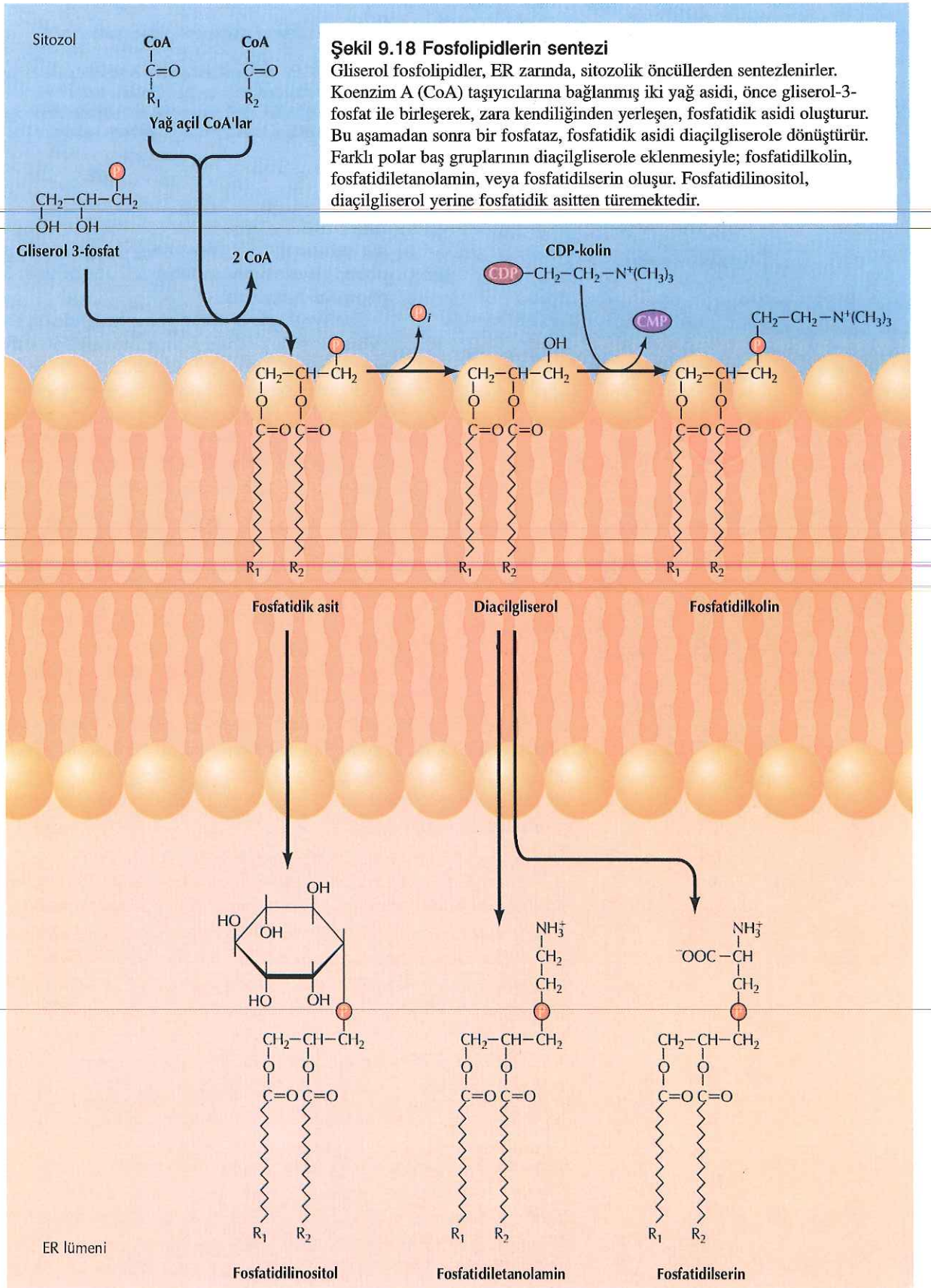
Zar yapısında bulunan ve salgılanan proteinlerin işlenmesinin yanı sıra, ökaryot hücrelerde ER, zar lipidlerinin sentezlendiği başlıca merkezdir. Son derece hidrofobik olmaları nedeniyle lipidler sitozolün



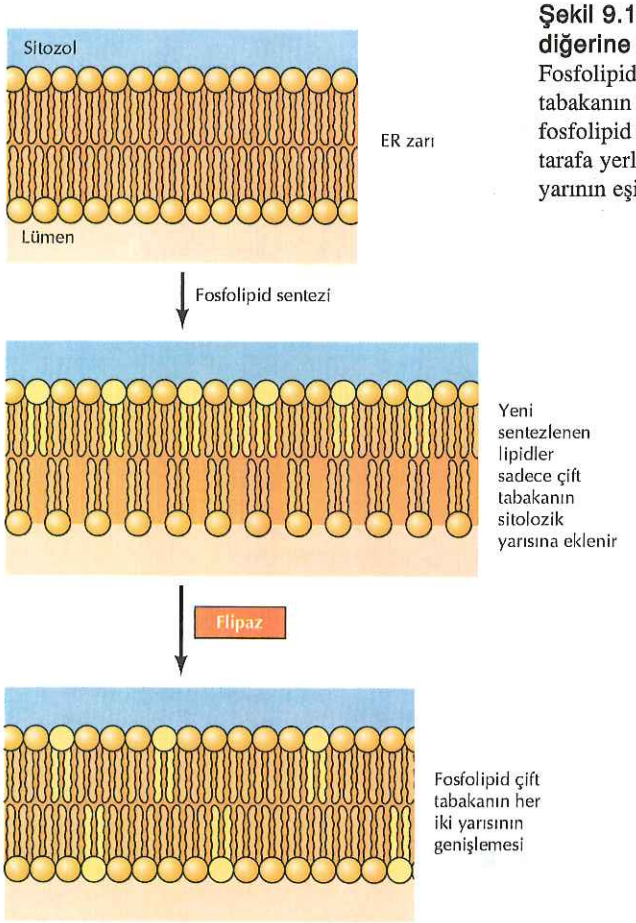
Şekil 9.17 Kalneksin ile protein katlanması

su temelli yapısında değil, hücresel zarlarla ilişkili olarak sentezlenirler. Bazı lipidler diğer hücresel zarlarda sentezleniyor olsa da, çoğunluğu ER içinde sentezlenir. Bölüm 10'da ve ilerleyen sayfalarda tartışılacağı gibi lipidler, ER'dan hücre içindeki son hedeflerine, veziküller veya taşıyıcı proteinler aracılığı ile ulaştırılırlar.

Ökaryot hücre zarları başlıca üç tip lipidden oluşturulur: fosfolipid, glikolipid ve kolesterol. Zar temel yapı taşları olan fosfolipidlerin çoğu gliserolden elde edilir. ER zarının sitozol tarafında, suda çözünebilen sitozolik öncül moleküllerden sentezlenirler (Şekil 9.18). Yağ asitleri, önce koenzim A taşıyıcılarından, gliserol-3-fosfata, zara bağlı bir enzim aracılığı ile aktarılırlar ve oluşan fosfolipid (fosfatidik asit) zar içine yerleşir. Sonra, ER zarının sitozol yüzünde yer alan enzimler, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin veya fosfatidilinositol oluşturmak üzere, değişik polar grupların eklenmesini



Şekil 9.18 Fosfolipidlerin sentezi
Gliserol fosfolipidler, ER zarında, sitozolik öncüllerden sentezlenirler. Koenzim A (CoA) taşıyıcılarına bağlanmış iki yağ asidi, önce gliserol-3-fosfat ile birleşerek, zara kendiliğinden yerleşen, fosfatidik asidi oluşturur. Bu aşamadan sonra bir fosfataz, fosfatidik asidi diaçilgliserole dönüştürür. Farklı polar baş gruplarının diaçilgliserole eklenmesiyle; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, veya fosfatidilserin oluşur. Fosfatidilinositol, diaçilgliserol yerine fosfatidik asitten türemektedir.



Şekil 9.19 Fosfolipidlerin, ER zarının bir yanından diğerine yer değiştirmeleri
Fosfolipidler ER zarının sitozolik yüzünde sentezlendiğinden, ikili tabakanın sadece sitozolik yüzüne eklenebilirler. Daha sonra fosfolipid flipaz enzimleri sayesinde zarın içinden geçerek karşı tarafa yerleşebilirler. Bu şekilde fosfolipid tabakasına ait her iki yarının eşit büyümesi sağlanır.

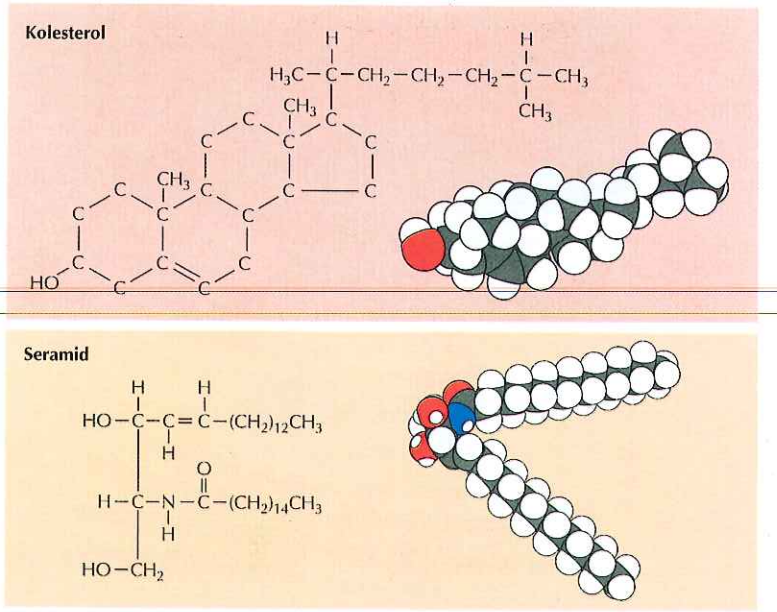
katalizler. Bu fosfolipidlerin ER zarının sitozol tarafında sentezlenmesi, hidrofobik yağ asitlerinin, suda çözünen öncülleri ile olan reaksiyonları zara bağlı enzimler tarafından katalizlenirken, zar içinde gömülü kalmalarına izin verir (örn., CDP-kolin). Ancak bu topografya nedeniyle, yeni fosfolipidler sadece ER zarının sitozol yüzeyine eklenebilirler (Şekil 9.19). Dolayısıyla kararlı bir zarın devamlılığını sağlamak için yeni sentezlenen fosfolipidler, ER zarının ikili tabakasının öteki yüzüne transfer edilmelidir. Bu olay polar baş gruplarının zar içine geçişini de içerdiğinden kendiliğinden gerçekleşmez. Bunun yerine, **flipaz** adı verilen zar proteinleri, fosfolipidlerin ER zarındaki hızlı yer değişimlerini katalizleyerek, ikili tabakanın her iki yarısının da dengeli büyümesini sağlar.

ER'un gliserol fosfolipidlerin sentezindeki rolü yanı sıra, diğer iki zar lipidi olan; kolesterol ve seramid için de temel sentez yeridir (Şekil 9.20). İleride tartışılacağı gibi seramid, Golgi aygıtında ya glikolipidlere ya da sfingomiyeline (gliserolden köken almayan tek zar fosfolipidi) dönüştürülür. Sonuç olarak ER, ökaryot hücre zarlarındaki temel lipidlerin, son ürünlerinin ve öncüllerinin sentezinden sorumludur. Kolesterol ve sfingomiyelin, Bölüm 12'de tartışılan lipid salların önemli yapı taşlarıdır.

Düz ER, özellikle lipid metabolizmasında aktif olan hücrelerde bol miktarda bulunur. Örneğin steroid hormonlar ER'da sentezlenir (kolesterolden). Testis ve yumurtalıktakiler gibi, steroid sentezleyen hücrelerde, düz ER yüksek miktarlarda bulunur. Buna ek olarak, yağda çözünen çeşitli maddeler, karaciğerdeki enzimler aracılığı ile işlemlendiklerinden, bu organ da oldukça fazla miktarda düz ER barındırmaktadır. Bu, toksin uzaklaştırıcı enzimler pek çok zararlı ilacı (örn., fenobarbital) suda çözünür hale getirerek, vücuttan üre ile atılmasını sağlarlar. Sonuçta düz ER, lipidlerin ve yağda çözünen maddelerin metabolizmasında, farklı basamaklarla ilişkilidir.

Protein ve Lipidlerin ER'dan Dışarı Çıkışları

Hem protein hem de lipidler, salgı yolağında, bir zardan tomurcuklanıp diğeriyle kaynaşan taşıyıcı veziküller içinde iletilirler. Diğer bir anlatımla, geçilebilir ER'dan tomurcuklanıp, kargolarını önce ER-Golgi ara bölmelerine, sonra da Golgi aygıtına aktaran veziküller

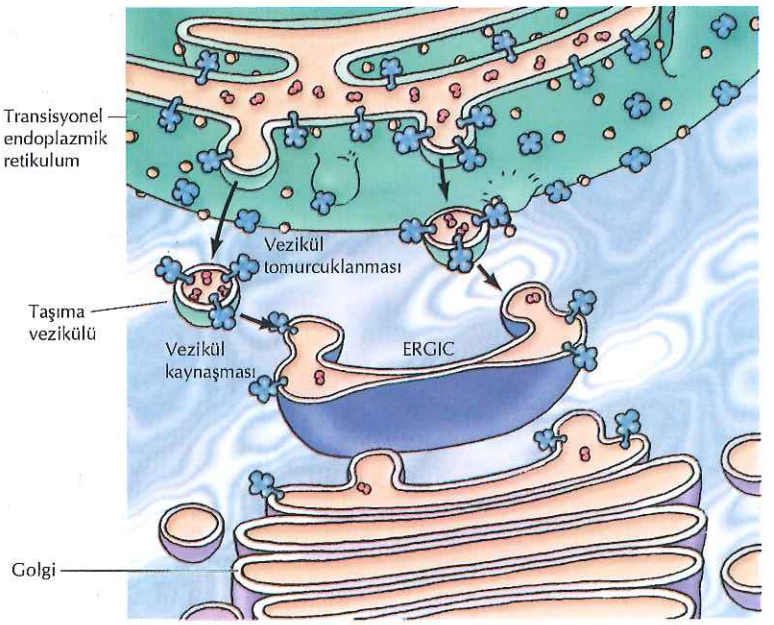


Şekil 9.20 Kolesterol ve seramidin yapısı
Kolesterolün halka karbonlarına bağlı hidrojenler gösterilmemiştir.

içinde taşınırlar (Şekil 9.21). Salgı yolağındaki birçok basamak, Golgi'nin farklı kompartmanları arasında ve Golgi'den lizozom veya plazma zarına olan vezikül taşınımı ile ilişkilidir. Bilinen her durumda, bir organelin iç boşluğunda bulunan proteinler, tomurcuklanan taşıyıcı veziküllerin içine paketlenir ve vezikül birleşmesi sonrasında alıcı organelin içerisine bırakılır. Zar protein ve lipidleri de, benzer şekilde taşınırlar. Bir zarla çevrili organelden diğerine taşınırken, topolojik yönelimlerinin korunması önemlidir. Örneğin, ER zarının sitozolik yüzünde yer alan bir protein, aynı şekilde Golgi ve plazma zarlarının da sitozolik yüzünde yer alır; öte yandan ER zarının lümen yüzünde yer alan proteinler, Golgi'nin de lümen yüzünde ve plazma zarının dışa bakan yüzünde yerleşir (bkz. Şekil 9.10).

Her ne kadar çoğu protein ER'dan Golgi'ye taşınırsa da, bazılarının, salgı yolağına katılmak yerine, ER'da tutulması gerekir. Özellikle ER'da işlevi olan proteinlerin (BiP, sinyal peptidaz, protein disülfid izomeraz ve daha önce tartışılmış olan proteinler) bu organelde kalması gerekir. Salgı yolağıyla uygun hedeflerine gitmek üzere sınıflanan proteinlerin ilk kavşak noktası, Golgi'ye taşınma veya ER'da tutulma kararıdır. Golgi'de tutulma ile lizozom veya plazma zarına gitme gibi benzer kavşak noktaları, taşınımın her basamağında karşımıza çıkmaktadır. Her durumda, özgül yerleşim sinyalleri, proteinleri doğru hücre içi yerleşim yerlerine hedefler.

ER'da tutulan veya gönderilen proteinler arasındaki ayırım, proteinleri ya, (1) Golgi'ye taşınmak üzere veya (2) ER'da tutulmak üzere işaretleyen iki farklı hedef dizi ile yönetiliyor gibi görünmektedir. Pek çok protein, karboksil uçlarındaki Lys-Asp-Glu-Leu (tek harfli koduyla, KDEL) hedef dizisinin varlığı nedeniyle, ER lümeninde tutulur. Normalde ER'da tutulan bir proteinden (örn., BiP



Şekil 9.21 ER'dan Golgi'ye veziküller ile taşınma
Protein ve lipidler ER'dan Golgi'ye, transisyonel ER zarından tomurcuklanan ve ER-Golgi ara bölmesi (ERGIC) vezikül ve tüpçüklerini oluşturmak üzere birleşen taşıyıcı veziküllerle aktarılır. Lümendeki ER proteinleri, veziküller içine alınır ve Golgi lümeninde serbest bırakılır. Zar proteinleri ER'daki yönelimlerini Golgi'de de aynen korurlar.

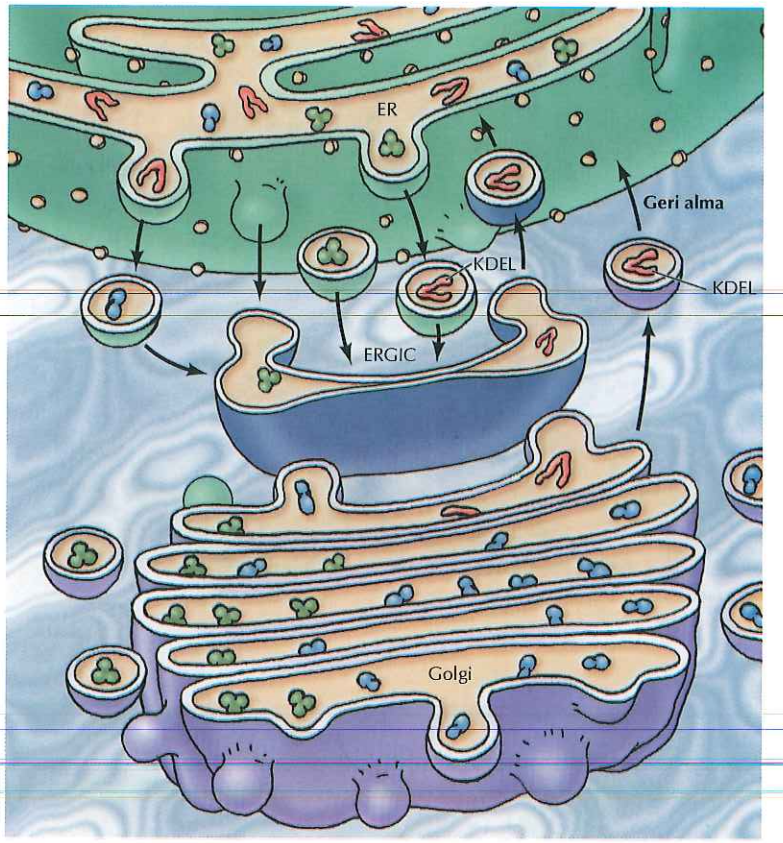
veya protein disülfid izomeraz) bu dizi uzaklaştırılırsa, mutant protein önce Golgi'ye taşınır, sonra da hücreden salgılanır. Buna karşılık normalde salgılanan proteinlere KDEL sekansının eklenmesi, onların ER'da tutulmalarına neden olur. Bazı transmembran proteinlerin ER'da tutulması, iki lizin barındıran kısa C-ucu dizileri tarafından belirlenir (KKXX dizileri).

İlginç olan, KDEL ve KKXX dizilerinin, ER proteinlerinin veziküllere paketlenip Golgi'ye taşınmalarını engellememeleridir. Bunun yerine, bu diziler bir geri dönüşüm yolunu kullanarak, ER proteinlerinin, seçili olarak ER-Golgi ara bölmesinden veya Golgi'den geri çekilmelerini ve ER'a geri dönmelerini sağlar (Şekil 9.22). KDEL ve KKXX dizilerini barındıran proteinler, bölmelerin zarlarında bulunan spesifik geri dönüşüm reseptörlerine bağlanarak, seçili olarak ER'a geri gönderilir.

KDEL ve KKXX en iyi tanımlanan tutulma / geri kazanılma dizileri olmakla birlikte, başkaları da bulunabilir. Buna ek olarak, bazı salgılanacak proteinler, aktif olarak ER'dan ayrılmalarını sağlayan sinyallerle işaretlenirler. Sonuç olarak, işaretsiz proteinlerin Golgi ve ilerisine taşındıkları veya tüm proteinlerin ER'da tutulmak ya da ayrılmak üzere özel olarak seçildikleri belirli bir yolağın varlığı henüz bilinmemektedir.

Golgi Aygıtı

Golgi aygıtı veya **Golgi kompleksi** ER'dan gelen proteinlerin daha ileri işlendiği ve endozom, lizozom, plazma zarı ve salgı gibi hedef bölgelerine gitmek üzere sınıflandırıldıkları bir fabrika gibi işlev görür. Buna ek olarak, daha önce de belirtildiği gibi, glikolipidler ve sfingomiyelin Golgi içinde sentezlenir. Bitki hücrelerinde Golgi

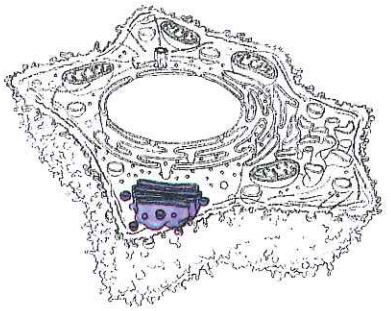


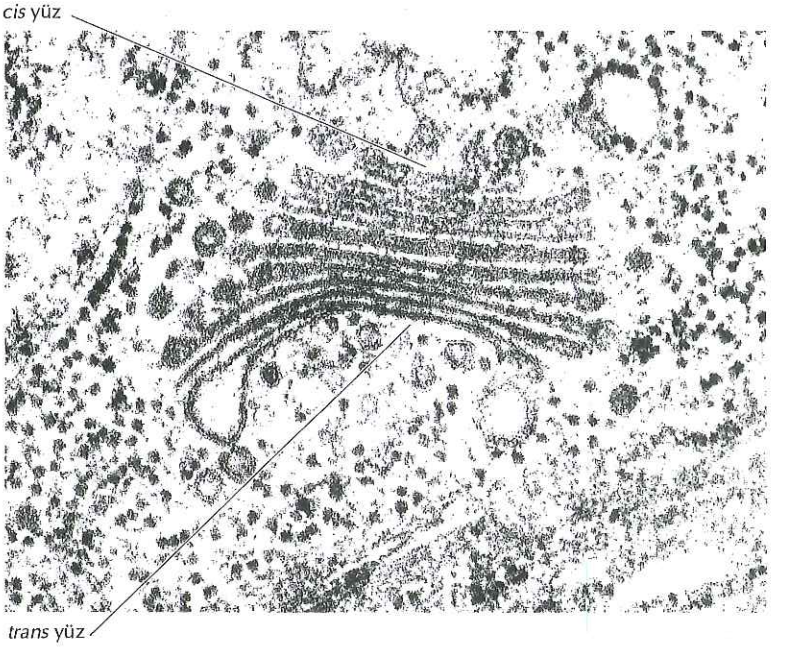
Şekil 9.22 ER'de kalacak proteinlerinin geri alınması
ER lümeninde kalacak olan proteinler karboksi uçlarından Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) dizisi ile işaretlenmişlerdir. Bu proteinler ER'dan Golgi'ye taşınırlar, ancak ERGIC veya Golgi'de bir reseptör tarafından tanınırlar ve seçili olarak ER'a geri gönderilirler.

kompleksi, hücre duvarının kompleks polisakkaridlerinin de sentezlendiği merkez olarak işlev görür. Sonuç olarak Golgi aygıtı, salgı yolağı boyunca hareket eden geniş bir yelpazedeki hücresel ürünlerin işlemlenmesiyle görevlidir.

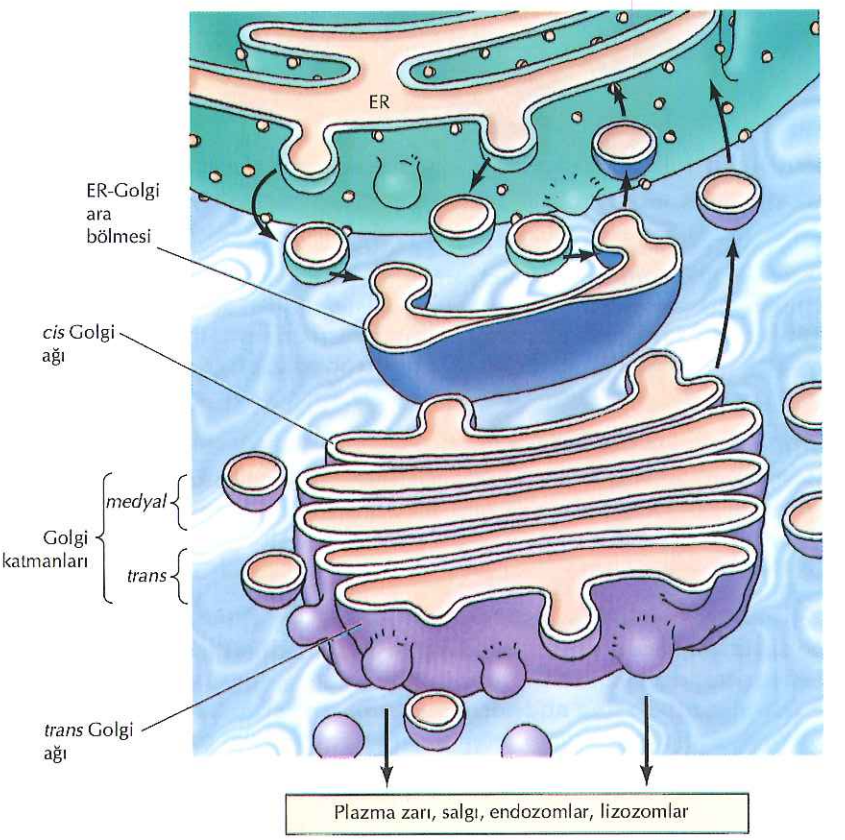
Golgi'nin Organizasyonu

Yapısal olarak Golgi, zarla çevrili, yassılaşmış keselerden (sarnıçlar) ve bunlarla ilişkili veziküllerden oluşmuştur (Şekil 9.23). Dikkat çeken bir özelliği, işlevsel ve yapısal olarak bariz bir polaritesinin bulunmasıdır. ER'dan gelen proteinler dışbükey yapıda ve genellikle nükleusa bakan tarafta yerleşik, *cis* yüzünden (giriş yüzü) giriş yaparlar. Sonra Golgi iç yapısından geçerek içbükey *trans* yüzünden çıkarlar. Golgi içinden geçtikleri sırada proteinler, değiştirilir ve hücre içindeki son hedeflerine taşınmak üzere sınıflanırlar. Belirli işlemleme ve sınıflama olaylarının, Golgi kompleksinde farklı bölgelerde, sıralı bir işlemler dizisi olarak gerçekleştiği görülmektedir. Bu nedenle Golgi'nin birden fazla sayıda bölmeden oluştuğu kabul edilir. Her ne kadar bu tür bölmelerin sayısı bilinmese de, genelde Golgi'nin işlevsel olarak ayrılmış dört bölmeden oluştuğu kabul edilir: ***cis* Golgi ağı**, **Golgi katmanları** (*medyal* ve *trans* alt bölmelere ayrılır), ve ***trans***





Şekil 9.23 Bir Golgi aygıtının elektron mikroskop fotoğrafı
Golgi aygıtı, yassılaşmış sarnıç katmanlarıyla, ilişkili veziküllerden oluşmuştur. ER'dan gelen proteinler ve lipidler Golgi aygıtının *cis* yüzünden giriş yaparlar ve *trans* yüzünden çıkarlar (Dr. L. Andrew Staehelin, University of Colorado, Boulder).



Şekil 9.24 Golgi aygıtının bölümleri
ER'dan gelen veziküller birleşerek, ER-Golgi ara bölmesini oluştururlar ve daha sonra ER'dan gelen proteinler, cis Golgi ağına aktarılır. ER'de kalması gereken proteinler, ER-Golgi ara bölmesi ve cis Golgi ağından, bir geri dönüşüm yolağı ile, geri gönderilir. Golgi kompleksinin orta kısımlarına denk gelen *medyal* ve *trans* Golgi bölmeleri, protein modifikasyonlarının çoğunun gerçekleştiği bölgelerdir. Bundan sonra proteinler; salgı, plazma zarı, endozom veya lizozomlara gitmek üzere sınıflandırıldıkları *trans* Golgi ağına taşınırlar.

Golgi ağı (Şekil 9.24). Proteinler ER'dan, ER-Golgi ara bölmesine taşınır ve oradan *cis* Golgi ağı yoluyla Golgi aygıtına giriş yapar. Daha sonra, metabolik olayların çoğunun gerçekleştiği Golgi katmanları, *medyal* ve *trans* bölmelerinde ilerler. Değiştirilmiş protein, lipid ve polisakkaridler; endozom, lizozom, plazma zarı ve hücre dışına gidecek şekilde sınıflanarak, dağıtım merkezi olarak işlev gören *trans* Golgi ağına geçerler.

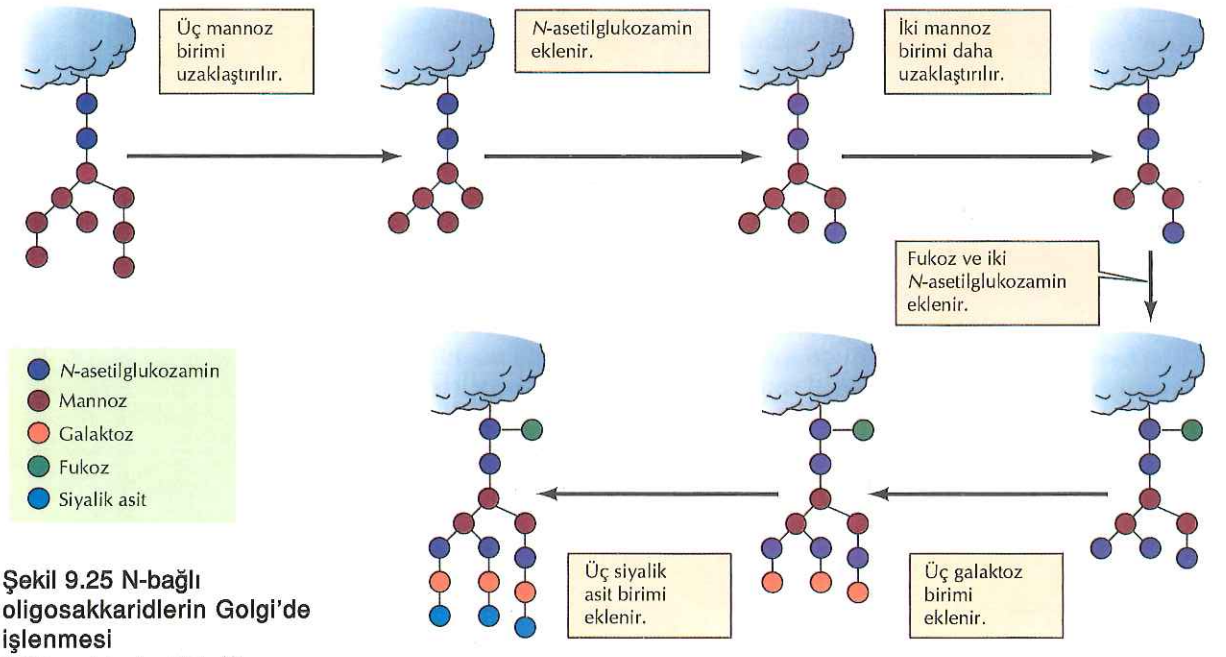
Her ne kadar Golgi aygıtı, 100 yıl önce, ilk kez tanımlanmışsa da, proteinlerin hangi mekanizmayla Golgi içinde hareket ettiği kesinlik kazanmamış olup, hücre biyologları arasında tartışma konusudur. Bir olasılık, taşıma veziküllerinin proteinleri farklı Golgi bölmelerinin sarnıçları arasında taşımasıdır. Buna karşın, proteinlerin Golgi bölmelerinden sırasıyla geçen, her aşamada olgunlaşarak Golgi içerisinde *cis*'den *trans*'a doğru hareket eden Golgi sarnıçları içerisinde taşındıklarına dair önemli düzeyde deneysel destek bulunmaktadır. Büyük olasılıkla, taşınma bu iki yolla da gerçekleşmektedir. Son çalışmalar Golgi'nin dinamik yapısının, sarnıç zarlarındaki proteinleri ile hücre iskeleti arasındaki etkileşimler sonucu korunduğunu ortaya koymaktadır.

Proteinlerin Golgi İçerisinde Glikozillenmesi

Golgi içindeki protein işlemlenmesi, glikoproteinlerin karbohidrat birimlerinin sentez ve modifikasyonunu içerir. İşlemlenmenin başlıca öğelerinden biri, ER'da proteinlere eklenen N-bağlı oligosakkaridlerin modifikasyonudur. Bu bölümde daha önceden tartışıldığı gibi proteinler ER içinde 14 şeker biriminden oluşan bir oligosakkaridin eklenmesiyle modifiye edilirler (bkz. Şekil 9.15). Daha sonra, polipeptidler henüz ER içindeyken üç glukoz ve bir mannoz birimi uzaklaştırılır. Golgi aygıtına taşınma sonrasında, bu glikoproteinlerin N-bağlı oligosakkaridleri, daha ileri işlenmeye tabi tutulur.

Golgi aygıtında N-bağlı oligosakkaridler, sıralı bir reaksiyon dizisi ile işlenir (Şekil 9.25). Salgı için, ya da plazma zarına hedeflenen proteinlerdeki ilk değişiklik, üç mannoz biriminin daha uzaklaştırılmasıdır. Bunu, sırayla N-asetilglukozamin eklenmesi, iki mannoz biriminin daha uzaklaştırılması ile bir fukoz ve iki tane daha N-asetilglukozaminin eklenmesi izler. Son olarak üç galaktoz ve üç siyalik asit birimi eklenir. Bölüm 7'de belirtildiği gibi, farklı glikoproteinler, değişik tipteki hücrelerin Golgi komplekslerinde bulunan enzim miktarına ve proteinin yapısına bağlı olarak, farklı düzeylerde modifiye edilirler. Buna bağlı olarak Golgi'den, çok değişik N-bağlı oligosakkaridlere sahip proteinler salınır.

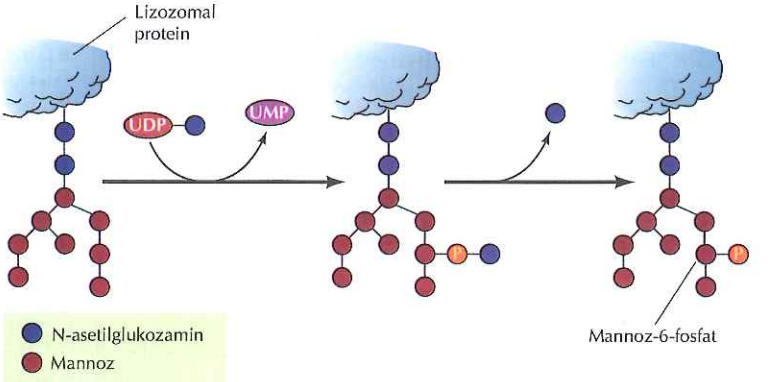
Lizozomal proteinlere ait N-bağlı oligosakkaridlerin işlemlenmesi, salgılanan ya da plazma zarına yerleşik proteinlerden farklıdır. Lizozomlara katılacak proteinler başlangıçtaki üç mannozun uzaklaştırılması yerine, mannoz fosforillenmesi ile değiştirilirler. Bu reaksiyonun ilk aşamasında, N-asetilglukozamin fosfatlar, büyük olasılıkla protein hala *cis* Golgi ağında iken, spesifik mannoz birimlerine eklenir (Şekil 9.26). Bu N-bağlı oligosakkaridlerin üzerinde **mannoz-6-fosfat** oluşmasını, N-asetilglukozamin grubunun uzaklaştırılması izler. Bu aşamadan sonra, ileri işlemlemelerde



Şekil 9.25 N-bağlı oligosakkaridlerin Golgi'de işlenmesi
ER'dan aktarılan N-bağlı oligosakkaridler, Golgi'de ardışık bir seri modifikasyonla ileri düzeyde değiştirilirler.

mannoz-6-fosfat birimleri uzaklaştırılmaz. Bunun yerine bu birimler, proteinleri lizozoma hedefleyen *trans* Golgi ağında, mannoz-6-fosfat reseptörleri tarafından seçici olarak tanınırlar.

Mannoz birimlerinin fosforillenmesi, lizozomal proteinlerin doğru hücre içi hedeflerine gönderilmek üzere sınıflanmasında çok önemli bir basamaktır. Sürecin özgüllüğünü, reaksiyonun ilk adımını -N-asetilglukozamin fosfatların lizozomal proteinlere seçili olarak eklenmesini-katalizleyen enzim belirler. Bu enzim salgı veya zar proteinlerinde olmayıp, lizozomal proteinlerde bulunan, belirleyici, yapısal bir oluşumu (determinantı) tanır. Bu yapısal oluşum, basit bir amino asit dizisi olmayıp, polipeptid zincirinin farklı bölgelerindeki amino asit dizilerinin katlanmış proteinlerde bir araya gelmesiyle oluşur. ER'daki protein translokasyonlarını yönlendiren sinyal dizilerinden farklı olarak, mannoz fosforillenmesine yol açarak,



Şekil 9.26 Lizozomal proteinlerin, mannoz birimlerinin fosfatlanması ile hedeflenmesi
Lizozomların yapısına katılacak proteinler, seçici olarak tanınır ve mannoz birimlerinin 6. pozisyonuna fosfat gruplarının eklenmesiyle modifiye edilir. Reaksiyonun ilk basamağında N-asetilglukozaminfosfat grupları, UDP-N-asetilglukozaminden mannoz birimlerine aktarılır. Sonra N-asetilglukozamin gruplarının uzaklaştırılmasıyla mannoz-6-fosfat elde edilir.

proteinleri lizozoma hedefleyen tanınma belirleyicisi, katlanmış proteinin üç boyutlu yapısına bağlıdır. Bu bölümde daha önce tartışılan doğrusal hedef sinyallerinden farklı olarak, bu tür oluşumlara **sinyal yamaları** denir.

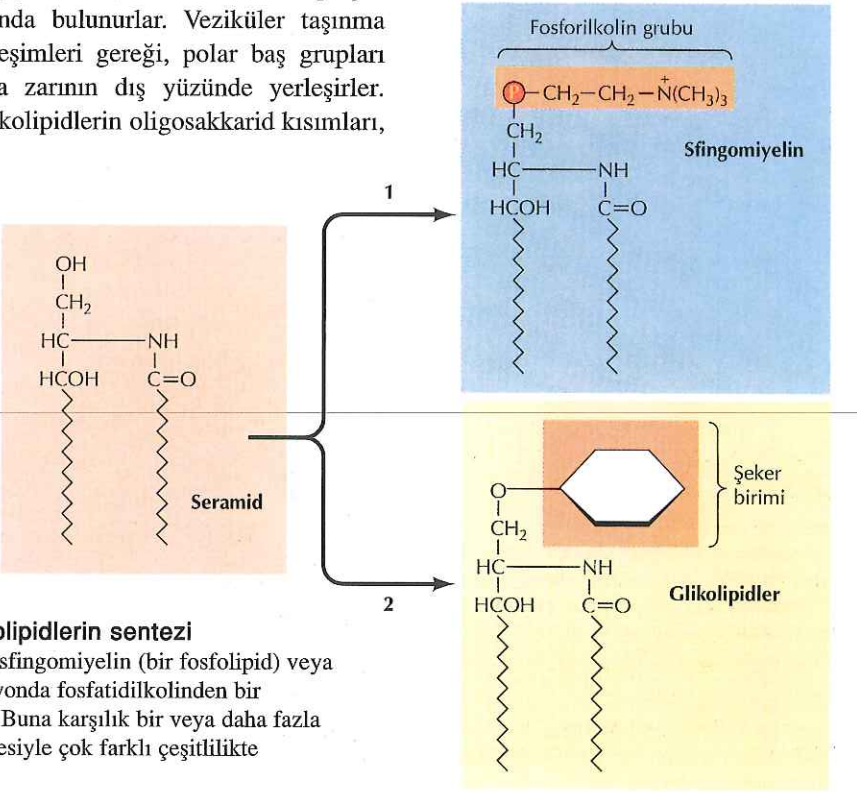
Proteinler ayrıca, spesifik amino asit dizileri içerisinde bulunan alıcı serin ve treonin birimlerinin yan zincirlerine karbohidratların eklenmesiyle de modifiye edilebilir (O-bağlı glikozillenme). (bkz. Şekil 7.30). Bu değişimler Golgi aygıtında, tekil şeker birimlerinin sırayla eklenmesiyle gerçekleşir. Genellikle serin veya treonin, doğrudan N-asetilglukozaminlere bağlanır ve buna başka şeker birimleri de eklenebilir. Bazı durumlarda bu şekerler, sülfat gruplarının eklenmesiyle daha da ileri modifikasyonlara uğrar.

Golgi İçindeki Lipid ve Polisakkarid Metabolizması

Glikoproteinlerin işlenmesi ve sınıflanmasının yanı sıra, Golgi aygıtı, lipid metabolizmasında özellikle de glikolipid ve sfingomiyelin sentezinde rol oynar. Önceden tartışıldığı gibi, gliserol fosfolipidler, kolesterol ve seramid ER'da sentezlenir. Daha sonra Golgi aygıtında, seramid kullanılarak, glikolipidler ve sfingomiyelin sentezlenir (Şekil 9.27). Sfingomiyelin (hücre zarlarındaki tek gliserolsüz fosfolipid) fosfatidilkolin'den, seramide bir fosforilkolin grubunun aktarımıyla sentezlenir. Buna alternatif olarak seramide, farklı karbohidrat gruplarının eklenmesi geniş çeşitlilikte glikolipidin oluşumunu sağlar.

Sfingomiyelin Golgi'nin lümene bakan yüzünde sentezlenir, ancak, glukoz seramide, sitozole bakan yüzde eklenir. Görünüşe göre, glukozilseramid lümene bakan yüze aktarılır ve diğer karbohidratlar bu tarafta eklenir. Ne sfingomiyelin ne de glikolipidler, bu aşamadan sonra, Golgi zarında konum değiştirmezler, bu nedenle Golgi çift tabakasının sadece lümen tarafında bulunurlar. Veziküler taşınma sonrasında, lümen tarafında yerleşimleri gereği, polar baş grupları dışarıya bakacak şekilde plazma zarının dış yüzünde yerleşirler. Bölüm 12'de tartışılacağı gibi, glikolipidlerin oligosakkarid kısımları, hücre-hücre etkileşimlerinde önemli yüzey belirteçleri olarak işlev görür.

Bitki hücrelerinde Golgi kompleksinin, hücre duvarının kompleks polisakkaridlerinin sentezlenmesi gibi ek bir görevi bulunmaktadır. Bölüm 12'de daha detaylı tartışılacağı gibi, bitki hücre duvarı başlıca üç tip polisakkaridden oluşur. Başlıca birleşeni olan sellüloz, glukoz birimlerinin basit doğrusal bir



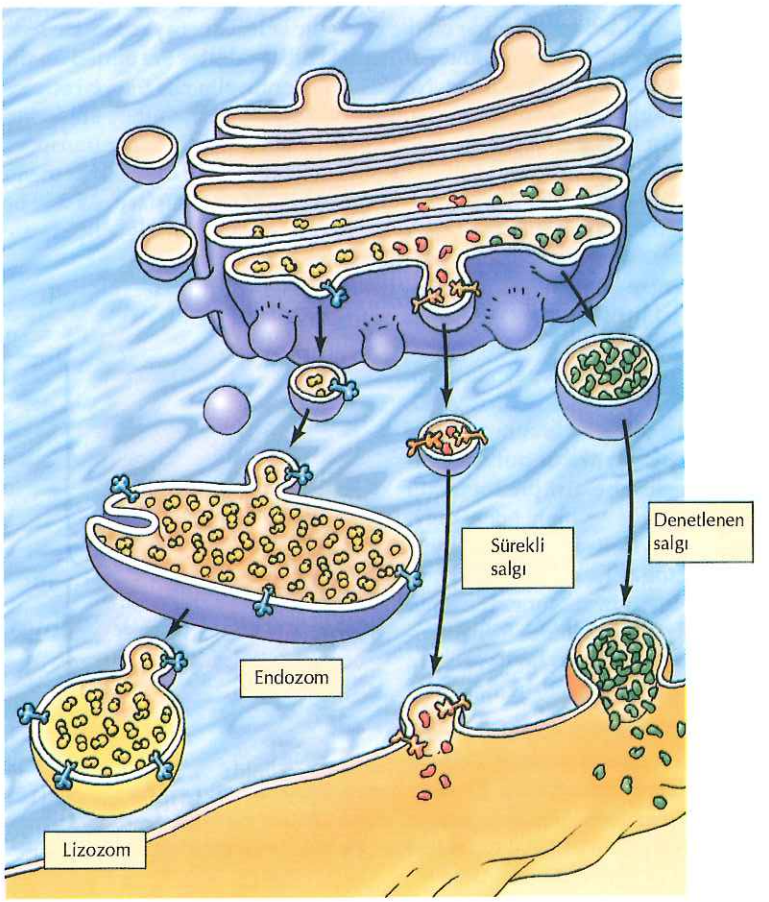
Şekil 9.27 Sfingomiyelin ve glikolipidlerin sentezi
ER'da sentezlenen seramid, Golgi'de sfingomiyelin (bir fosfolipid) veya glikolipidlere dönüştürülür. İlk reaksiyonda fosfatidilkolinden bir fosforilkolin grubu seramide aktarılır. Buna karşılık bir veya daha fazla şeker grubunun (örn., glukoz) eklenmesiyle çok farklı çeşitlilikte glikolipidin sentezi de mümkündür.

polimeridir. Hücre yüzeyinde, plazma zarındaki enzimler tarafından sentezlenir. Diğer hücre duvarı polisakkaridleri (hemiselülozlar ve pektinler) ise kompleks, dallı zincir moleküller olup, önce Golgi aygıtında sentezlenir sonra veziküller aracılığıyla hücre yüzeyine taşınırlar. Bu hücre duvar polisakkaridlerinin sentezi bitki hücrelerinde önemli bir hücresel işlev olup, Golgi aygıtı metobolik aktivitesinin %80'ini polisakkarid sentezine ayrılabilmektedir.

Proteinlerin Golgi Aygıtında Sınıflandırılması ve Dışarı Gönderilmesi

Proteinler, lipidler ve polisakkaridler, Golgi aygıtından son yerleşim yerlerine salgı yolağıyla taşınırlar. Bu süreç, *trans* Golgi ağından tomurcuklanan farklı türlerdeki vezikküllere proteinlerin dağıtılmasını ve vezikül içeriğinin, uygun hücresel yerleşim yerine gönderilmesini kapsar (Şekil 9.28). Bazı proteinler Golgi'den plazma zarına, yeni protein ve lipidlerin zara yerleşmelerine ve hücreden sürekli protein salgılanmasına olanak sağlayan, genel bir salgı yolağında taşınırlar. Diğer bazı proteinler ise, özel olarak denetlenen bir yolla plazma zarına gönderilir veya hayvan hücrelerinde lizozom, mayalarda vakuoller gibi, diğer hücre içi yerleşim yerlerine hedeflenirler.

Golgi aygıtında işlevi olan proteinler, salgı yolağında ilerlemek yerine bu organel içinde tutulmalıdırlar. ER'dan farklı olarak, Golgi



Şekil 9.28 Golgi aygıtından taşınma
Proteinler *trans*-Golgi ağında sınıflandırılarak, veziküller içerisinde son hedeflerine ulaştırılırlar. Özgül hedef sinyallerin yokluğunda, proteinler genel salgı yolağı ile plazma zarına taşınırlar. Diğer bir seçenek, proteinlerin, endozom, lizozom veya denetlenmiş salgılanma için hedeflenerek, genel salgı yolağı dışına çıkarılabilmesidir.

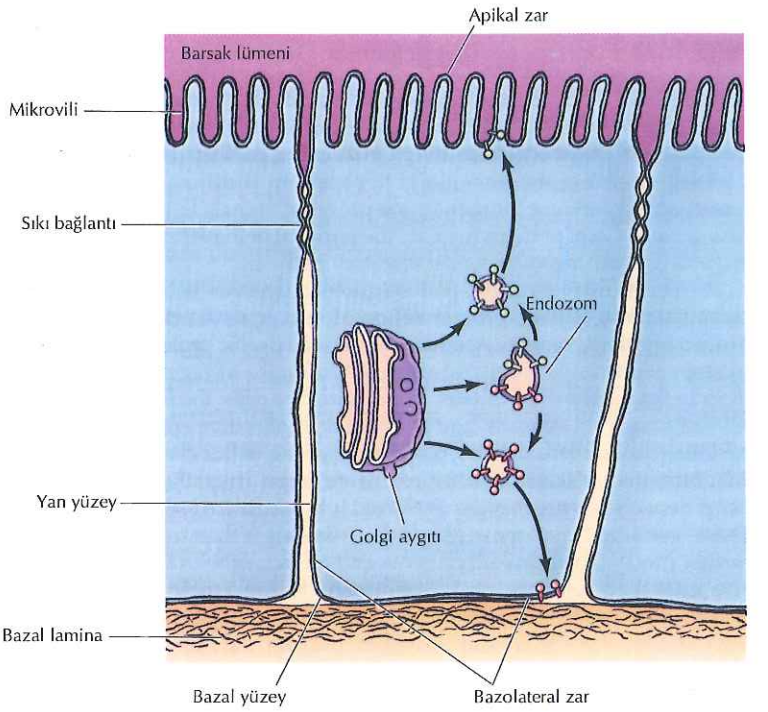
içerisinde tutulan tüm proteinler lümen içerisinde çözünmüş olarak değil, Golgi zarları ile ilişkili olarak bulunurlar. Bazı proteinlerin Golgi'de tutulmasından sorumlu olan ve proteinin taşıyıcı veziküllere paketlenerek, *trans*-Golgi ağını terk etmesini engelleyen sinyaller, proteinlerin transmembran bölgelerinde yerleşiktir. Buna ek olarak, yerleşik ER proteinlerindeki KKXX dizileri gibi, bazı Golgi proteinlerinin sitoplazmik kuyruklarındaki diziler, proteinlerin salgı yolağındaki ardışık bölmelerden geri dönüşümünü sağlarlar.

Tüm hücrelerde işlev gören genel (konstitütif) salgı yolağı, denetimsiz ve sürekli protein salgısına yol açar. Ancak bazı hücreler buna ek olarak, çevresel uyarılara cevap veren, denetimli bir salgı yolağına sahiptirler. Denetlenebilen salgı yolaklarına örnek olarak; endokrin hücrelerinden hormonların salınması, nöronlardan sinirselileticinin salınışı ve bu bölümün başında tartışılan pankreas asiner hücrelerinden sindirim enzimlerinin salınımı (bkz. Şekil 9.2) verilebilir. Proteinler, özelleşmiş salgı veziküllerine paketlendikleri *trans*-Golgi ağı içerisinde, düzenlenen salgı yolaklarına dağıtılırlar. Taşıyıcı veziküllerden büyük olan, bu olgunlaşmamış salgı vezikülleri, protein içeriklerini daha ileri düzeyde işlerler ve sıklıkla birbirleri ile kaynaşırlar. Ayrıca, uygun sinyaller plazma zarı ile kaynaşmalarını uyarana kadar, içeriklerini depolarlar. Örneğin pankreas asiner hücreleri tarafından sentezlenen sindirim enzimleri, salgılanmaları, mide ve ince barsaktaki besinler tarafından tetiklenene kadar, olgun salgı veziküllerinde depolanırlar. Düzenlenen salgı yolağına proteinlerin sınıflanarak dağıtılması, bu yolağa giren çok sayıdaki proteinin ortak özelliği olan sinyal yamalarının tanınması ile ilgilidir. Bu proteinler *trans*-Golgi ağı içerisinde seçici olarak bir araya gelirler ve sonra olgunlaşmamış salgı vezikülleri olarak tomurcuklanma ile serbestleşirler.

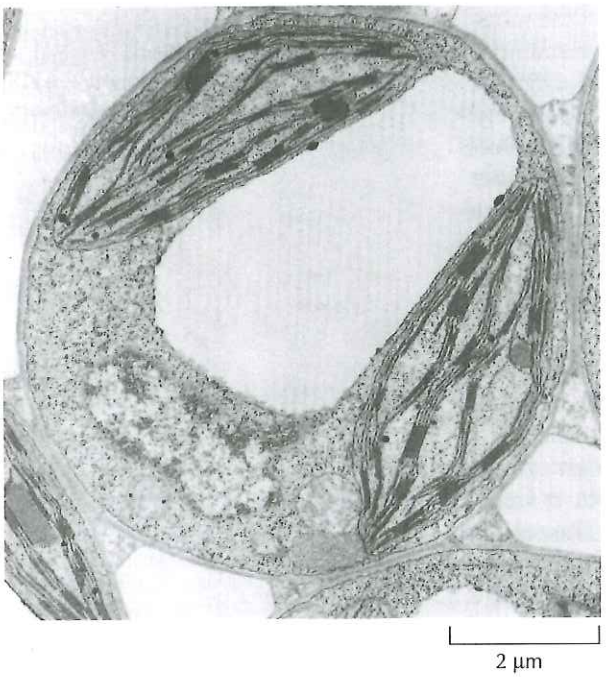
Dokularda organize olduklarında polar özellik kazanan çoğu epitel hücresinde, proteinlerin plazma zarlarına iletilmesinde bir zorluk daha ortaya çıkar. Bu tip hücrelerin plazma zarları, kendi özgül işlevlerine göre farklı proteinleri barındıran, **apikal bölge** ve **bazolateral bölge** olarak iki farklı bölgeye ayrılır. Örneğin, barsak epitel hücrelerinin apikal zarı barsak lümenine bakar ve besinlerin emiliminde görevlidir. Hücrenin kalan kısmı bazolateral zar ile çevrilidir (Şekil 9.29). Plazma zarlarına ait farklı bölgeler epitel dışında başka değişik hücre tiplerinde de bulunur. Sonuç olarak, genel salgı yolağı proteinleri *trans*-Golgi ağından, bu farklı plazma zarı bölgelerine seçici olarak taşınmalıdır. Bu sorun, proteinlerin, seçici olarak hücrenin apikal ya da bazolateral plazma zarını hedefleyen en az iki tip genel salgı veziküline paketlenmesiyle, çözümlenmektedir. Bu paketlenme *trans*-Golgi ağında veya endozom içerisinde gerçekleşebilir.

Golgi içerisinde en iyi tanımlanmış protein sınıflandırılması, proteinlerin lizozoma seçici olarak taşınmasıdır. Önceden tartışıldığı gibi, lümendeki lizozomal proteinler Golgi aygıtına girdikten hemen sonra, N-bağlı oligosakkaridlerindeki bir değişiklikle oluşan mannoz-6-fosfat ile işaretlenirler. *Trans*-Golgi ağı zarlarındaki özgül bir reseptör bu mannoz-6-fosfat birimlerini tanır. Bu tanıma sonucunda oluşan reseptör-lizozomal enzim kompleksi, lizozoma hedeflenen taşıyıcı veziküllere paketlenir. Lizozomal zar proteinleri mannoz-6-fosfat ile değil, sitoplazmik kuyruklarındaki diziler ile lizozoma hedeflenirler.

Şekil 9.29 Polarize hücrelerde plazma zarına taşıma
Polarize olmuş epitel hücrelerinin plazma zarları, apikal ve bazolateral bölgelere ayrılmıştır. Bu örnekte (barsak epiteli) hücrenin apikal yüzeyi barsak boşluğuna bakarken; yan yüzeyler komşu hücreler ile ilişkidedir ve alt (bazal) yüzey de hücre dışı matrise (bazal lamina) yaslanmaktadır. Proteinler apikal veya bazolateral zarlara, *trans*-Golgi ağında ya da endozomda hedeflenirler. Komşu hücreler arasındaki sıkı bağlantılar, bu iki bölge arasındaki protein difüzyonunu önleyerek, apikal ve bazolateral zar özelliklerinin korunmasını sağlarlar.



Şekil 9.30 Bir bitki hücresi vakuolü
Orta alandaki büyük vakuol, besin depolanması ve ozmotik basıncın korunumu gibi görevlerinin yanı sıra bir lizozom gibi de işlev görmektedir. (E. H. Newcombe / Biological Photo Service)



Lizozom bulunmayan maya ve bitki hücrelerinde proteinler, Golgi aygıtından, farklı bir hedefe, **vakuole** (Şekil 9.30) hedeflenir. Bu hücrelerde vakuol lizozom işlevlerinin yanı sıra, besinlerin depolanması, ozmotik ve turgor basınçlarının düzenlenmesi gibi ek görevleri de üstlenir. Lizozomal hedeflenmenin aksine, proteinler vakuole karbohidrat işaretler yerine kısa peptid diziler ile yönlendirilir.

Veziküller Taşınma Mekanizması

Bu bölümün önceki kısımlarından da anlaşılacağı gibi, taşıma vezikülleri, salgı yolağının zarla çevrili farklı bölmeleri arasındaki molekül trafiğinde önemli rol oynarlar. Bölüm 12'de tartışıldığı gibi veziküller, hücre yüzeyinden alınan maddelerin taşınması ile de ilişkilidirler. Sonuç olarak veziküler trafik, zarla çevrili farklı kompartmanlar arası moleküler trafikten sorumlu önemli bir hücresel aktivitedir. Dolayısıyla böyle bir trafiğin seçiciliği hücrenin işlevsel organizasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Örneğin, lizozomal enzimlerin, plazma zarına ya da ER'a değil, Golgi aygıtından spesifik olarak lizozomlara taşınması gerekmektedir. Belirli proteinleri lizozom gibi spesifik organellere hedefleyen sinyaller bu bölümün önceki sayfalarında tartışılmıştır. Bu proteinler veziküller içinde taşındığından, taşıma özgüllüğü, taşınacak kargonun sadece doğru hedef zarı tanıyacak ve kaynaşacak veziküllerin içinde, seçici olarak, paketlenmesi temeline dayanır. Ökaryot hücre yapılanmasında veziküler taşımanın büyük önemi nedeniyle, vezikül paketlenmesini,

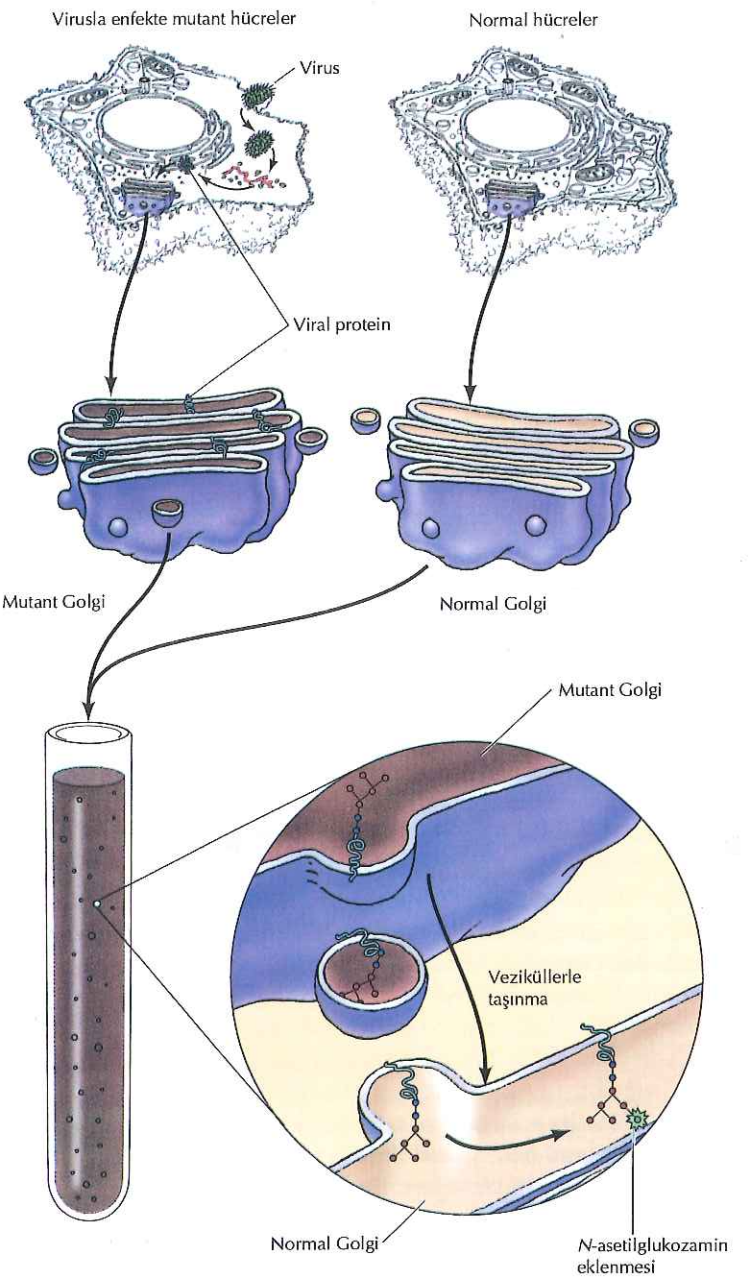
tomurcuklanmayı ve zar kaynaşmasını kontrol eden moleküler mekanizmaları anlamak hücre biyolojisinin başlıca araştırma alanlarından biridir.

Veziküler Taşınmayı Anlamaya Yönelik Deneysel Yaklaşımlar

Veziküler transportun moleküler mekanizmalarının aydınlatılması üç farklı deneysel yaklaşımla gerçekleştirilmiştir: (1) protein sınıflanması ve taşınmasında hatalı maya mutantlarının izolasyonu (2) veziküler taşınmanın, hücre içermeyen sistemlerde yapılandırılması (3) nöronların nörotransmiter salgılama denetiminden sorumlu sinaptik veziküllerin biyokimyasal analizi. Taşıma sisteminin farklı yönlerinin anlaşılmasında, her bir deneysel yaklaşımın birbirinden farklı avantajları bulunmaktadır. Hepsinden önemlisi, her üç araştırma alanında ortaya çıkan bulguların örtüşmesinin, maya ile memeli nöronu gibi birbirinden oldukça farklı hücrelerde bile, benzer moleküler mekanizmaların salgı yolağını düzenlediğini göstermiş olmasıdır.

Genetik analiz kolaylıkla yapılabildiğinden maya hücresi kullanımı, hücre biyolojisinin diğer alanları gibi, salgı yolağı araştırmalarında da avantajlara sahiptir. Özellikle Randy Schekman ve arkadaşları, veziküler taşıma hatalı maya mutantlarının izolasyonunda öncülük etmişlerdir. Bu mutantlar arasında; protein salgılamasının değişik basamaklarında hatalı olan mutantlar (*sec* mutantları), proteinleri vakuollere taşıyamayan mutantlar ve ER'da yerleşecek proteinleri yerinde tutamayan mutantlar bulunmaktadır. Maya mutantlarının izolasyonu, doğrudan moleküler klonlamaya ve ilgili genin analizine yol açmış, sonuç olarak, salgı yolağının farklı basamaklarında görevli proteinler tanımlanabilmiştir. Örneğin, endoplazmik retikulumda protein yer değiştirme kanallarının önemli bir bileşeni olan Sec61, bu bölümde daha önce tartışılmıştır.

Veziküler taşımanın, yeni yapılandırılmış sistemler kullanılarak yapılan biyokimyasal çalışmaları, genetik çalışmaları desteklemiş ve memeli hücrelerinden taşıma proteinlerinin doğrudan izolasyonuna olanak sağlamıştır. İlk, hücre içermeyen taşıma sistemi, Golgi aygıtında bölmeler arası protein taşınmasını inceleyen James Rothman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Şekil 9.31). Grubun deneysel tasarımı, Golgi aygıtında erken bir modifikasyon basamağında, N-bağlı oligosakkaridlere N-asetilglukozamin birimi ekleyen enzimin mutant olduğu bir memeli hücre hattının kullanımını gerçekleştirmiştir (bkz. Şekil 9.25). Sonuç olarak, bu mutant hücre hattı tarafından üretilen glikoproteinler, N-asetilglukozamin birimleri içermemekteydi. Ancak, mutant hücre hattından izole edilen Golgi katmanları, normal bir hücre hattından izole edilen Golgi katmanları ile birlikte inkübe edildiğinde, mutant hücrelerin sentezlediği glikoproteinlere N-asetilglukozamin eklendiği gösterilmiştir. Çeşitli deneyler bu sonucun, proteinlerin, mutant hücre hattının Golgi katmanlarından normal hücre katmanlarına vezikküllerle taşınması nedeniyle elde edildiğini ortaya koymuş ve böylece, N-asetilglukozamin eklenmesi, yeniden yapılandırılmış sistemde veziküler taşınma için ölçülebilir bir belirteç olmuştur. ER'dan Golgi'ye, Golgi'den salgı vezikküllerine, vakuollere ve plazma zarına veziküler taşınmayı da içeren farklı bölmeler arası transportu incelemek için, benzer yeniden yapılandırılmış sistemler geliştirilmiştir. Bu *in vitro* sistemlerin geliştirilmesi, vezikül



Şekil 9.31 Yeni yapılandırılan veziküler taşıma
N-bağlı oligosakkaridlere N-asetilglukozamin ekini katalizleyemeyen, virus ile enfekte mutant bir hücre hattından elde edilen Golgi katmanları, normal hücrelerden elde edilen Golgi katmanları ile karıştırılır. Mutant hücre hattı virüs ile enfekte olduğundan, özgül olarak ayırt edilebilir. Bu proteinlerin normal Golgi katmanlarına transferi N-asetilglukozamin eklenmesi ile saptanır.

tomurcuklanması ve kaynaşmasında rol oynayan bazı proteinlerin doğrudan izolasyonunun yanı sıra, taşıma sürecinin biyokimyasının çalışılmasına ve maya mutantlarında tanımlanan proteinlerin işlevsel analizine olanak sağlamıştır.

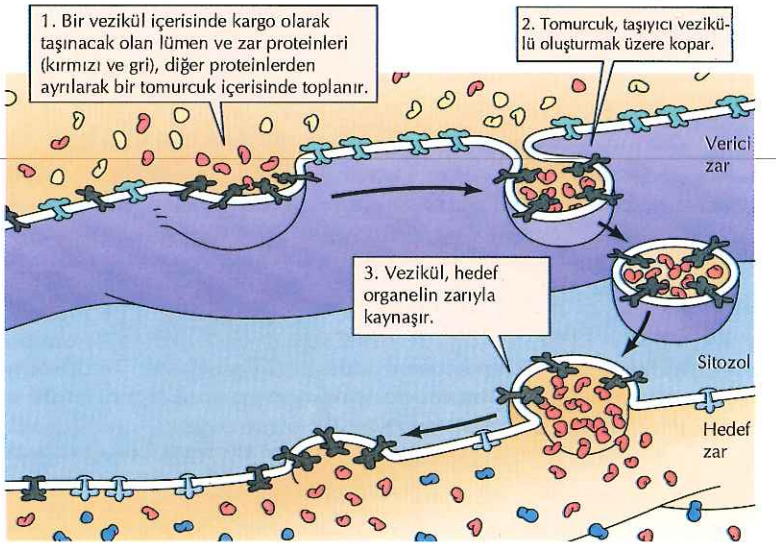
Veziküler taşınmanın moleküler mekanizmaları ile ilgili önemli edinimler, kontrollü salgılamanın yüksek oranda özgülleşmiş bir biçimini temsil eden nöronlardaki sinaptik ileti çalışmalarından sağlanmıştır. Sinaps, bir nöron ile başka bir hücrenin–bir diğer nöron veya kas hücresi gibi bir efektör olabilir- bir araya geldiği yerdir. Sinapsta, sinaptik veziküllerde depolanan asetilkolin gibi sinirsel ileticiler (nörotransmiter) aracılığıyla bilgi aktarımı gerçekleşir. Aktarıcı nöronun tetiklenmesi sinaptik veziküllerin plazma zarına

kaynamasına ve sonuç olarak sinirsel ileticilerin sinaps boşluğuna salınarak post-sinaptik nöronu veya efektör hücreyi etkilemesine yol açar.

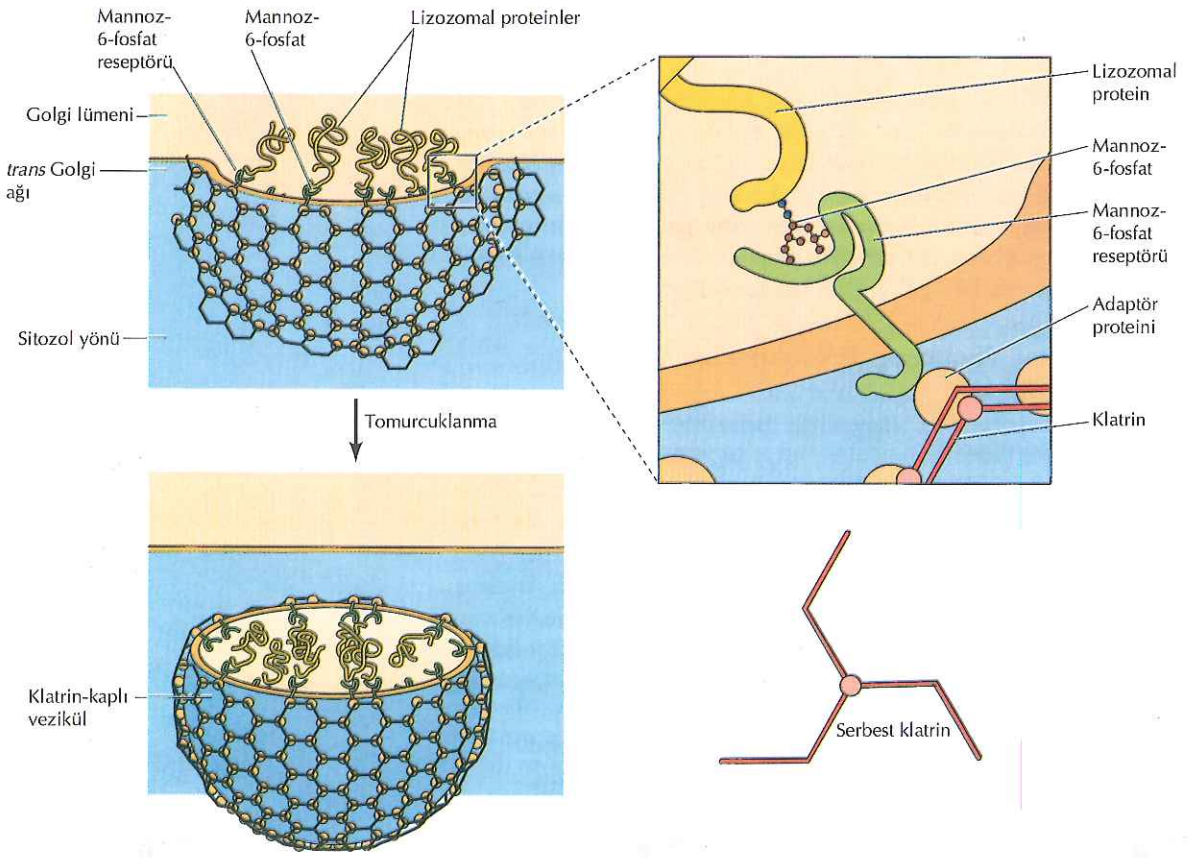
Sinaptik veziküller beyin dokusunda, biyokimyasal analizleri için gereken izolasyonlara izin verecek kadar yüksek miktarlarda bulunurlar. Sinaptik veziküllerden izole edilen proteinlerin bazıları, maya genetiği ve yeniden yapılandırılmış sistemler sayesinde veziküler transportta önemli rolleri olduğu gösterilmiş olan proteinlerle büyük benzerlik taşır. Bu proteinlerin biyokimyasal analizi veziküler kaynaşma ile ilgili önemli veriler sağlamıştır.

Kargo Seçimi, Kaplayıcı Proteinler ve Vezikül Tomurcuklanması

Transmembran proteinler, lümendeki proteinler ve reseptörlerinin veziküller içinde paketlenmesi için, salgı yolağının her basamağında üç işleme ihtiyaç vardır (Şekil 9.32). İlk olarak, kargo proteinleri sınıflandırılarak, başka yerlere hedeflenen veya geride kalması gereken proteinlerden ayrılır. İkinci olarak, zar üzerinde kargoyu barındıran bir tomurcuk gelişmeli ve zardan ayrılarak bir taşınma vezikülü oluşturmalıdır. Üçüncü olarak da, taşıma vezikülü hedef zara gitmeli ve onunla kaynaşmalıdır. Taşıyıcı veziküllerin çoğunun oluşumu, vezikülü kaplayan proteinler ile doğrudan etkileşebilen adaptör moleküller aracılığıyla küçük GTP-bağlayan proteinler tarafından düzenlenir. Vezikül tomurcuklanması ile ilişkilendirilmiş, bilinen üç farklı GTP- bağlayan protein ailesi bulunmaktadır: en iyi tanınan üyesi ARF1 olan ADP-ribozilasyon faktörleri, Sar1, ve Rab proteinlerini içeren büyük bir protein ailesi. Adaptör veya efektör proteinlerine GTP-bağlayan proteinlerin, ardışık ve destekleyici biçimde bağlanması, *trans* Golgi ağında, endozom veya lizozomlara gidecek taşıyıcı veziküllerin oluşum ve tomurcuklanması gibi özgül süreçler için zar üzerinde bir platform oluşturur. Kompleksteki farklı proteinler, farklı yerlere hedeflenen taşıyıcı veziküllerin oluşumu ve vezikül kaynaşmasında (bu bölümde ileride anlatılacaktır) rol oynayabilirler, ancak her protein kompleksi spesifik bir tomurcuklanma, taşıma veya kaynaşma sürecine özgüldür.



Şekil 9.32 Taşıyıcı veziküllerin oluşumu ve kaynaşması



Şekil 9.33 Lizozomal proteinlerin klatrin kaplı veziküllere yerleşimi
Lizozomlara hedeflenen proteinler, *trans* Golgi ağındaki özgül reseptörlere bağlanan mannoz-6-fosfat ile işaretlenmiştir. Mannoz-6-fosfat reseptörleri, Golgi zarını kat ederek, klatrin bağlayacak olan, sitozolik adaptör proteinleri kendisine bağlar. Klatrin, zar yapısını değiştirerek veziküler tomurcuklanmayı başlatan sepet benzeri bir yapı oluşturan üç protein zincirinden oluşmuştur.

Taşıyıcı veziküllerin çoğu, sitozolik proteinlerle kaplanmıştır. Bu nedenle kaplı veziküller olarak anılırlar. Her biri ayrı tip veziküler taşımada işlev gören üç çeşit kaplı vezikül tanımlanmıştır. İlki, endositoz (bkz. Bölüm 12) ile hücre dışı moleküllerin plazma zarından içeriye alınmasının yanı sıra, moleküllerin *trans* Golgi ağından endozom ve lizozomlara taşınmasından sorumlu olan **klatrin kaplı veziküllerdir** (Şekil 9.33). ER ve Golgi kompleksinden tomurcuklanan iki tip, farklı, kaplı vezikül tanımlanmıştır. Bu veziküllere, non-klatrin kaplı veya **COP-kaplı veziküller** denir (COP, 'coat' protein den geliyor). Bu veziküllerden biri olan COPII-kaplı vezikül, ER'dan tomurcuklanıp, kargosunu salgı yolağında ileriye doğru taşıyarak, Golgi aygıtına götürür. Buna karşılık, COPI-kaplı veziküller, ER-Golgi ara bölmelerinden veya Golgi aygıtından tomurcuklanır ve Golgi ile ER yapısında kalacak olan proteinlerin yolakta geriye doğru taşınmasında işlev görür. Örneğin COPI –kaplı veziküller, KDEL veya KKXX geriye dönüş sinyallerini barındıran ER proteinlerini, *cis* Golgi ağı veya ER-Golgi ara bölmelerinden ER'a geri taşırlar. Salgı sırasında bir Golgi kesesinden diğerine hareket eden veziküller üzerindeki kaplama proteininin (eğer varsa) özellikleri bilinmemektedir.

Trans Golgi ağında klatrin kaplı veziküllerin oluşumu için; klatrin, iki farklı adaptör proteini ve GTP-bağlayan protein ARF1'e gereksinim vardır. Kompleksin bir araya gelmesi çok iyi düzenlenen bir süreçtir (Şekil 9.34). Önce, ARF/GDP, Golgi zarındaki proteinlere bağlanır. Zarda bulunan ARF-guanin nükleotid değişim faktörü GDP'nin GTP ile değişimini uyarır. Tomurcuklanma, mannoz-6-fosfat

ve klatrin için bağlanma bölgeleri olan iki adaptör proteinin, ARF/GTP tarafından komplekse katılmasıyla başlar. **Klatrin**, sepet benzeri bir yapı oluşturarak, zar yapısının dışa doğru bombeleşmesini ve vezikül tomurcuklanmasını sağlayan yapısal bir rol oynar.

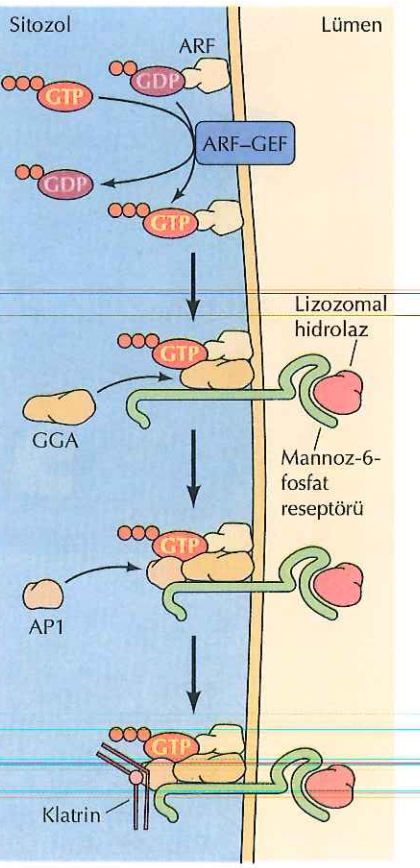
Taşınma sürecinde ARF'e bağlı GTP, GDP'ye hidroliz olur ve tekrar kullanılmak üzere zardan ayrılır. Bu, kaplanma kompleksini bir arada tutan bağları zayıflatır ve sitoplazmada bulunan Hsp70'lerin, vezikül zarında bulunan kaplama proteinlerinin çoğunu ayırmasına olanak verir. Bu işlem sonrasında kalan proteinlerin bazıları, *trans* Golgi ağından endozom ve lizozomlara hareket eden veziküllerin, Bölüm 11'de anlatılan tübülin yapıdaki özgül motor moleküllere bağlanarak, hedefe mikrotübüller üzerinden ulaşmalarını sağlar.

Vezikül Kaynaşması

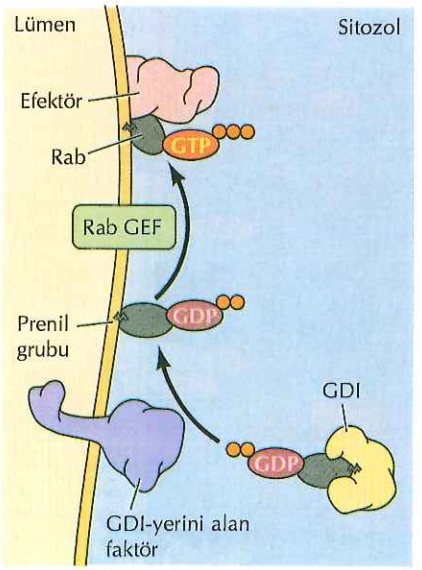
Taşıyıcı veziküllerin kaynaşması (füzyonu) için iki farklı olayın gerçekleşmesi gerekir. İlk olarak, taşıma veziküllerinin doğru hedef zarı tanıması gerekmektedir. İkincisi, vezikül içeriğinin hedef organele ulaştırılması için, vezikül ve hedef zarlar birbirleri ile kaynaşmalıdır. Son yıllardaki araştırmalar vezikül kaynaşması için birkaç model geliştirilmesini sağlamıştır, buna göre, vezikül ile hedef zar arasındaki spesifik ilişki, vezikül ile hedef zarlar üzerindeki özgül proteinler arası etkileşim ile sağlanmakta ve fosfolipid çift tabakalar arasında kaynaşma bundan sonra gerçekleşmektedir.

Vezikül birleşmesinde görevli proteinler, ilk olarak, James Rothman'ın laboratuarında, *in vitro* yapılandırılmış memeli hücre veziküler taşıma sistemlerinin biyokimyasal analizleri sonucu tanımlanmıştır. (bkz. Şekil 9.31). Bu sistemlerdeki vezikül kaynaşmasında görevli proteinlerin analizi, Rothman ve arkadaşlarının, veziküler kaynaşmanın vezikül ve hedef zarlarda bulunan, SNARE adı verilen spesifik transmembran protein çiftleri tarafından düzenlendiğini öngören (vezikül SNARE, v-SNARE; hedef SNARE, t-SNARE) **SNARE hipotezi** olarak adlandırılan genel bir model ileri sürmelerine yol açmıştır. Bu hipoteze göre, veziküller üzerinde bulunan v-SNARE'ler ile hedef zarlarda bulunan t-SNARE'lerin bir kompleks oluşturmaları zarların kaynaşmasına yol açmaktadır. Bu hipotez, sinaptik veziküller üzerinde SNARE'lerin tanımlanması ve çeşitli vezikül taşınma aşamaları için SNARE kodlayan maya salgı mutantlarının keşfiyle desteklenmiştir. Örneğin, mayada ER'dan Golgi'ye taşınma, hem vezikül hem de hedef zarda yerleşik spesifik SNARE'lere gereksinir.

Son araştırmalar, vezikül kaynaşması için SNARE'lerin gerektiğini ve SNARE-SNARE bağlanmasının, iki lipid tabakasını birbirine, kararsızlaşıp kaynaşmalarını sağlayacak kadar yakınlaştırmak için gerekli enerjiyi sağladığını kanıtlamıştır. Ancak, taşıma veziküllerin hedef zarlara yanaşması, bağlanması ve kaynaşması, vezikül tomurcuklanmasındaki gibi, sırayla bir araya gelen bir protein kompleks tarafından düzenlenmektedir. Taşıyıcı veziküllerin yanaşmasında, GTP-bağlayan proteinlerden olan **Rab** aile üyeleri anahtar rol oynar. ARF ailesi gibi, Rab proteinleri de vezikül taşınma sürecinde tomurcuklanma ve kaynaşma reaksiyonlarının pek çoğuna katılırlar. Farklı vezikül taşınma süreçlerinde işlevi olan 60'dan fazla, değişik Rab proteini tanımlanmıştır (Tablo 9.1). SNARE-SNARE komplekslerinin oluşumunu düzenlemek üzere SNARE'ler ile bağlanmaları de dahil, vezikül trafiğinin pek çok basamağında işlev görürler.



Şekil 9.34 Klatrin kaplı vezikül oluşumunun ARF tarafından tetiklenmesi
Küçük bir GTP-bağlayan protein olan ARF, *trans* Golgi zarında klatrin kaplı vezikül oluşumunu tetikler. Zara taşındıktan sonra ARF/GDP, özgül bir ARF-guanin nükleotid değişim faktörü tarafından ARF/GTP'ye aktive edilir. ARF/GTP, zara bir GGA adaptör proteini çeker. GGA, lizozomal hidrolaz enzimini taşıyan mannoz-6-fosfat reseptörünün sitoplazmik kuyruğu ile ilişkiye geçerek reseptörü zara getirir. GGA aynı zamanda klatrin kılıfın montajı için bir bağlanma bölgesi olan ikinci bir adaptör proteini, AP1'i, komplekse çeker.



Şekil 9.35 Rab'ın bir zara taşınması
Küçük bir GTP-bağlayan protein olan Rab, zara yerleşimini sağlayan bir prenil grubunun eklenmesiyle değişir (bkz Şekil 7.32). Rab, sitozolde kendisini Rab/GDP formunda tutan bir GDP ayrışma önleyici (GDI) bağlı olarak taşınır. Zarda, özgül olmayan bir GDI yerini-alan faktör, Rab/GDP'ı GDI'den uzaklaştırarak zar içine yerleştirir. Ortamda özgül bir Rab-guanin nükleotid değişim faktörü varlığında, Rab'daki GDP, GTP ile değiştirilir ve aktif Rab/GTP diğer efektör proteinler ile ilişkiye geçebilir. Doğru Rab-guanin nükleotid değişim faktörünün ortamda bulunmaması halinde, Rab/GDP bir GDI tarafından zardan uzaklaştırılır ve başka bir zara taşınır.

Rab proteinleri bireysel olarak veya Rab protein bileşenleri halinde, farklı organelleri ve taşıyıcı vezikülleri belirleyerek, veziküler transportun özgüllüğünü sağlamada anahtar rol oynarlar (Şekil 9.35). Rab proteinleri sitozolde GDP-ayrışma önleyiciler (GDI) ile, GTP-bağlı formda taşınırlar. Bir zara geldiklerinde, GDI- yerini-alan faktör tarafından GDI uzaklaştırılır. Özgül, guanin nükleotid değişim faktörleri Rab/GDP'yi aktif Rab/GTP durumuna dönüştürür. Belirli guanin nükleotid değişim faktörleri özgül zarlarda yerleşiktir ve özgül Rab aile üyelerini etkilerler, böylece, doğru zarlarda aktif Rab/GTP komplekslerinin oluşumundan sorumludurlar. Uygun değişim faktörünün yokluğunda Rab proteinleri Rab/GDP olarak kalırlar ve zardan uzaklaştırılırlar.

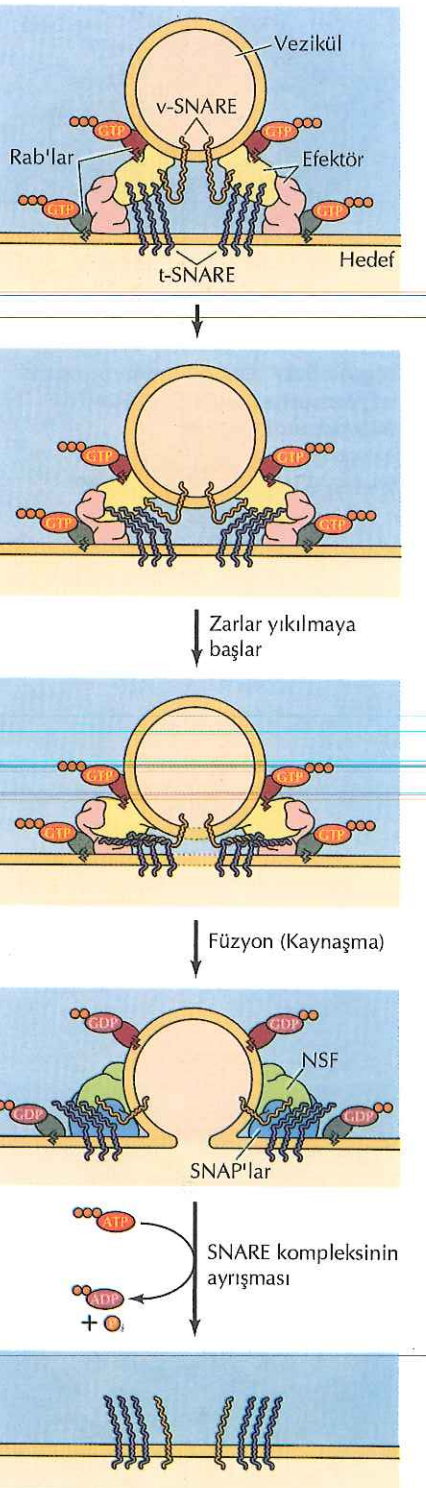
Taşıma vezikülü kaynaşmasını başlatmak için, vezikülün üzerindeki Rab/GTP, efektör proteinleri ve v-SNARE'leri, kaynaşma öncesi kompleksini oluşturmak üzere, ortama çeker (Şekil 9.36). Hedef zardaki farklı bir Rab proteini de, benzer şekilde, efektör proteinleri ve t-SNARE'leri düzenler. Taşıma vezikülü bu hedef zarla karşılaşınca, efektör proteinler zarları protein-protein etkileşimleriyle birbirine bağlar. Vezikülün hedef zara tutunması, v- SNARE'lerin t- SNARE'ler ile etkileşime girmesini sağlar. Tüm SNARE proteinleri, nükleer laminlerdeki gibi, bir dolanmış-sarmal (coiled-coil) alt birimine sahiptirler (bkz. Şekil 8.31). Laminlerdeki gibi, bu bölge diğer dolanmış-sarmal bölgelere sıkıca bağlanmakta, SNARE'leri birbirine kenetleyerek, iki zarı, neredeyse birbirleriyle doğrudan temas kuracak kadar yaklaştırmaktadır. Bu durum, lipid çift tabakasında bir kararsızlık yaratarak, iki zarın birbirleriyle kaynaşmasına yol

TABLO 9.1 GTP bağlayan Rab proteinleri ve işlev gördükleri bölgeler

Taşınma aşaması	İlgili Rab proteini
Eksositoz	
Transisyonel ER'dan Golgi'ye	Rab1, Rab1b, Rab2
Golgi'den geri ER'a	Rab6, Rab6b
Golgi içi	Rab1, Rab6, Rab6b
trans-Golgi ağından plazma zarına	Rab11a, Rab11b
Endositoz	
Plazma zarından erken endozoma	Rab5a, Rab5b, Rab5c
Erken endozomdan plazma zarına	Rab4, Rab15, Rab18
Erken endozomdan geç endozoma	Rab7
Özel işlevler	
Salgı granüllerinin eksositozu	Rab8b
Geç endozomdan *trans*-Golgi ağına	Rab9, Rab11a, Rab11b
trans-Golgi ağından bazolateral zara	Rab8a
trans-Golgi ağından apikal zara	Rab21

Yerleşimi ve olası işlevleri bilinen 60 memeli Rab proteininden örnekler

Şekil 9.36 Vezikül kaynaşması
Vezikül kaynaşması Rab/GTP tarafından tetiklenir. Vezikül ve hedef zarlardaki Rab proteinleri, efektör proteinlere bağlanarak, vezikül ile hedef zarı yakın bir konuma getirir ve v-SNARE ile t-SNARE'lerin birbirleri ile ilişkiye geçmelerini sağlar. Molekülleri birbirlerine yaklaştırmak için gereken enerji sağlandığı takdirde, SNARE'lerin dolanmış-sarmal bölgeleri bir fermuar gibi birbirlerine bağlanır. Zarların bu fiziksel yakınlığı, lipid çift tabaka yapısının kararlılığını bozar ve vezikül ile hedef zar kaynaşır. Protein-protein ilişkilerinde oluşan değişiklikler NSF ve SNAP'leri SNARE kompleksine çeker ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji kullanılarak, kompleks kendisini oluşturan parçalara ayrılır.



açmaktadır. Zar kaynaşmasını takiben NRF/SNAP kompleksi SNARE kompleksini birimlerine ayırarak, SNARE'lerin, takip eden vezikül taşınma döngülerinde tekrar kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. Nasıl ki SNARE- SNARE etkileşimlerinde açığa çıkan enerji zar kaynaşmasını sürüklüyorsa, SNARE'leri ayırmak için de aynı şekilde ATP hidrolizi sonucu açığa çıkan enerjinin kullanımı gerekmektedir.

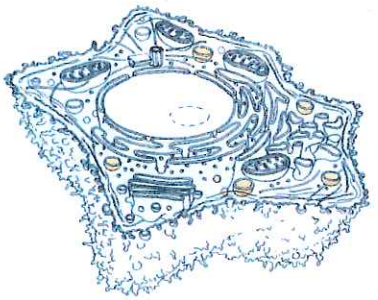
Lizozomlar

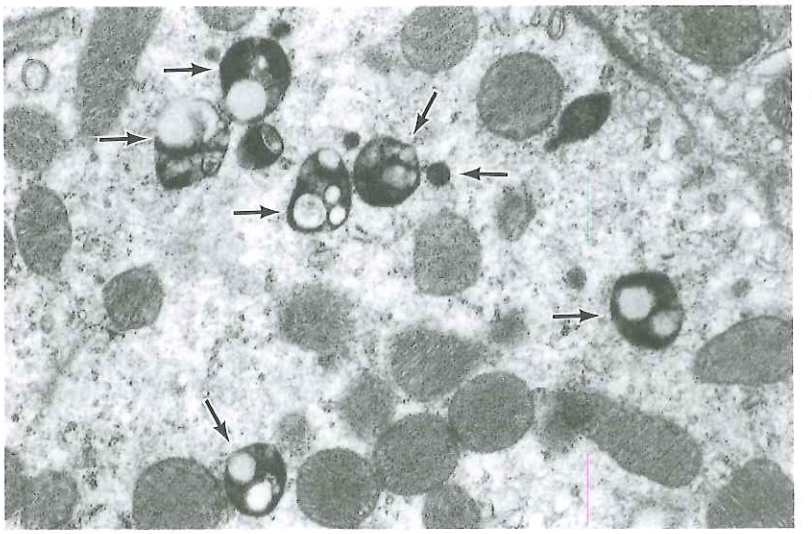
Lizozomlar, protein, nükleik asit, karbohidrat ve lipid gibi her türlü biyolojik polimeri parçalayacak enzimler içeren, zarla çevrili organellerdir. Lizozomlar hem hücre dışından alınan maddeleri yıkarak hem de hücrenin kendi, kullanılmayan veya yıpranmış yapılarını sindirerek hücrenin sindirim sistemi olarak işlev görür. En basit şekilleri yoğun yuvarlak vakuoller olarak görülür; ancak sindirilmek üzere içeriye alınan farklı maddelere bağlı olarak farklı boyut ve şekillerde gözlenebilir (Şekil 9.37). Sonuç olarak lizozomlar, farklı hücre içi materyalin yıkımından sorumlu, yapısal çeşitlilik gösteren organeller olarak tanımlanır.

Lizozomal Asit Hidrolazlar

Lizozomlar; DNA, RNA, polisakkarid ve lipidleri hidrolize eden 50 kadar farklı yıkım enzimini barındırırlar. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, etkilenen kişilerde lizozom içi materyalin birikimi nedeniyle, **lizozomal depo hastalıkları** olarak tanımlanan 30'dan fazla genetik hastalıktan sorumludur. Bu hastalıkların çoğu, lizozom enzimlerden tekinin yetmezliğinin sonucudur. Örneğin Gaucher hastalığı (bu tür hastalıkların en yaygın gözleneni) glikolipidlerin yıkımı için gereken bir enzimi kodlayan gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkar. İlgi çekici bir istisna, Golgi aygıtında, lizozomal enzimlerin mannoz-6-fosfat ile işaretlenmesinin ilk adımını katalizleyen enzimdeki bozukluk sonucu gözlenen I-hücre hastalığıdır (bkz. Şekil 9.26). Bunun sonucu, lizozomal enzimlerim lizozom içerisine alınımlarında genel bir başarısızlık olarak görülür.

Tüm lizozomal enzimler lizozom içi asit pH'da (5 civarı) aktif olan, ancak sitoplazmanın nötral pH'ında (7.2 kadar) aktivite göstermeyen asit hidrolazlardır. Lizozomal hidrolazların asidik pH'ya gereksinmeleri, sitozol içeriğinin istenmeyen sindirimine karşı çifte korunma sağlamaktadır: lizozomal zar parçalansa dahi serbest kalan asit hidrolazlar, sitoplazmanın nötral pH'ında etkisiz hale geçerler. İç asidik pH'larını korumak için lizozomlar aktif olarak H^+ iyon (proton) konsantrasyonlarını yüksek tutmak zorundadır. Bu durum lizozomal





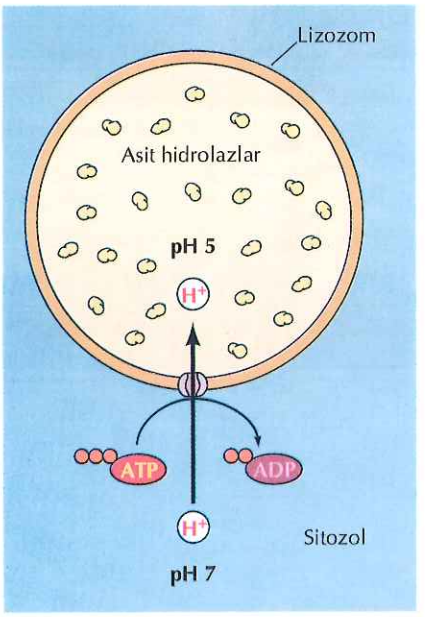
Şekil 9.37 Bir memeli hücresinde lizozom ve mitokondrilerin elektron mikroskop fotoğrafı
Lizozomlar okla gösterilmiştir (K.G.Murti / Visuals Unlimited)

zarda, sitozolden lizozom içine aktif olarak protonları taşıyan bir proton pompası ile sağlanır. Lizozom içinde sitozolden yaklaşık 100 kat daha yoğun bir H^+ konsantrasyon oluşumunu sağlayan bu pompalar için, ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerjiye ihtiyaç bulunmaktadır.

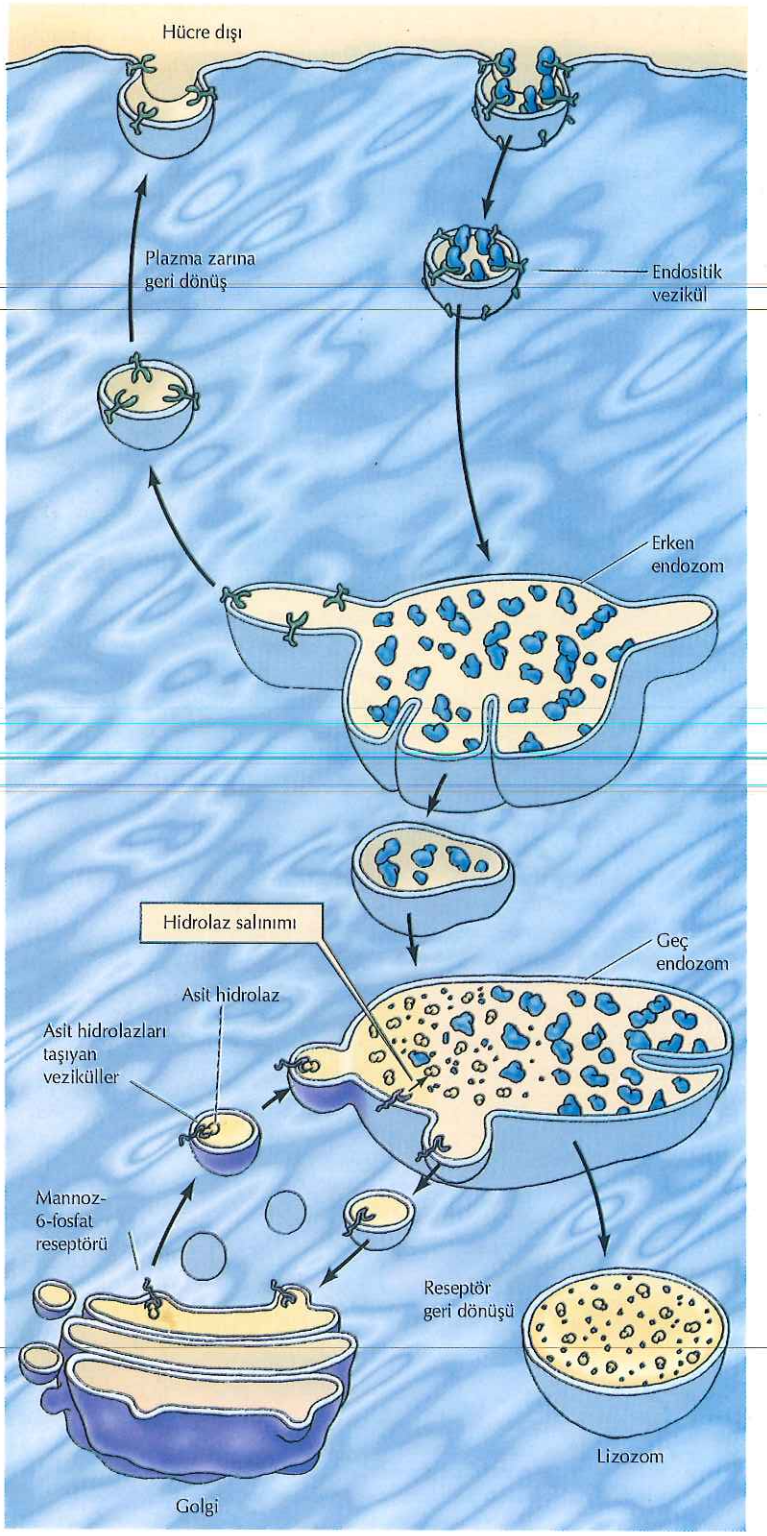
Endositoz ve Lizozom Oluşumu

Lizozomların başlıca işlevlerinden biri, Bölüm 12'de detaylarıyla tartışılacak olan, **endositoz** yoluyla hücre dışından alınan maddelerin sindirimidir. Ancak lizozomların endositoz yoluyla alınan maddelerin sindirimindeki rolleri, sadece işlevle değil, oluşumlarıyla da ilişkilidir. Öncelikle, lizozomlar, plazma zarından endositoz yoluyla alınmış maddeleri içeren endozomların, *trans* Golgi ağından tomurcuklanan taşıma vezikülleri ile kaynaşması sonucu oluşur.

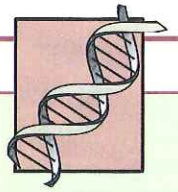
Endozom ve lizozomların oluşumu, lizozomal proteinlerin işlendiği salgı yolağı ile, hücre yüzeyinden hücre dışı moleküllerin alındığı endositik yolağın kesişimini simgelemektedir (Şekil 9.39). Hücre dışındaki madde, plazma zarından tomurcuklanan ve erken endozomlar ile kaynaşan klatrin kaplı endositik veziküller içinde alınır. Zar bileşenleri, yeniden kullanılmak üzere, plazma zarına geri gönderilir (Bölüm 12'de detaylı olarak tartışılmıştır). Erken endozomlar, aşamalı olarak, lizozom öncülleri olan geç endozomlara olgunlaşırlar. Endozom olgunlaşması sırasındaki önemli değişikliklerden biri, *trans* Golgi ağından lizozomal asit hidrolazların transferini gerçekleştirmek üzere, iç pH'ın 5.5 civarına indirilmesidir.



Şekil 9.38 Lizozom organizasyonu
Lizozomlar, kendi içlerindeki asidik pH'da aktif olup, sitozolun nötr pH'ında inaktif olan çeşitli asit hidrolazlar barındırırlar. Lizozomların iç asidik pH'sı, ATP hidrolizi ile sitozolden protonları lizozom içine aktaran bir proton pompası ile sağlanır.



Şekil 9.39 Endositoz ve lizozom oluşumu
Hücre dışındaki moleküller, erken endozomlar ile kaynaşan endositik veziküller aracılığıyla hücre içine alınır. Erken endozomlar, geç endozomlara olgunlaşırken, zar birleşenleri geri alınır. Golgi aygıtından asit hidrolazları taşıyan veziküller geç endozomlar ile birleşerek, lizozomal enzimlerin tamamına sahip lizozoma olgunlaşmalarını sağlarlar. Taşıyıcı veziküller geç endozomlar ile kaynaştığında, asit hidrolazlar mannoz-6-fosfat reseptörlerinden ayrılır. Reseptörler tekrar kullanılmak üzere Golgi aygıtına geri döner.



MOLEKÜLER TIP

Gaucher Hastalığı

Hastalık

Gaucher hastalığı, lizozomların normal koşullarda parçalayabildikleri maddeleri, yıkamamaları sonucu gözlenen lizozomal depo hastalıklarının en yaygın olanıdır. Yıkılamayan bileşiklerin birikimi, lizozomların sayı ve boyutlarında artışa ve sonuç olarak, hücrelerin işlev görememesi nedeniyle organ patolojilerine yol açmaktadır. Gaucher hastalığı öncelikle Yahudi toplumunda ve 1/2500 oranında görülür. Hastalığın, şiddet derecesi ve sinir sistemi tutulumu yönünden farklılıklar gösteren üç tipi bulunmaktadır. En sık gözlenen formunda (tip I) sinir sistemi tutulmamıştır, hastalık kendini dalak ve karaciğer büyümesi ve kemik lezyonları ile gösterir. Gaucher hastalığının bu formuna sahip pek çok hastada ciddi semptomlar izlenmemekte ve yaşam süreleri etkilenmemektedir. Hastalığın daha ciddi formları (tip II ve III), hem Yahudi hem de Yahudi olmayan topluluklarda, çok daha nadir olarak izlenir. En yıkıcı olan, yaşamın ilk aylarında yaygın nörolojik tutulum gösteren ve erken yaşta ölüme götüren, tip II hastalığıdır. Tip III hastalığı, şiddeti açısından tip I ve II arasında olup, demans ve spastik bulguları da içeren nörolojik semptomlar 10 yaş civarında ortaya çıkar.

Moleküler ve Hücresel Temel

Eksikliği Gaucher hastalığına yol açan lizozomal enzim, glukoserebrosidin, glukoz ve seramide ayrışmasını katalizleyen glukoserebrozidazdır (şekle bakınız). Bu enzim eksikliği 1965'de gösterilmiş ve sorumlu gen 1985'de klonlanmıştır. O günden bu yana, Gaucher hastalığına yol açan 30'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Oluşan mutasyonun özelliğine göre hastalık şiddetinin öngörülebilmesi ilgi çekicidir. Örneğin, göreceli olarak basit, asparajin yerine serin amino asit değişimine neden olan bir mutasyon, tip I hastalığına yol açarken; prolinin lösin yerine geçmesine yol açan bir mutasyon, daha şiddetli enzim yetmezliklerine neden olur ve tip II veya III hastalığına yol açar.

Hastalığın çok nadir gözüken tip II ve III formları dışında, Gaucher hastalığında etkilenen hücreler yalnızca makrofajlardır. İşlevleri, yaşlı ve hasarlı hücreleri fagositoz yoluyla ortadan kaldırmak olduğundan, makrofajlar normalde lizozomlarda parçalanan, yüksek miktarda lipid içeren bileşikleri fagositoz yoluyla içlerine almaktadır. Glukoserebrozidaz yetmezliği, hastalıktan birinci derecede etkilenen organların karaciğer ve dalak olmasıyla uyumlu olarak, özellikle bu organlarda bulunan makrofajlarda belirgindir.

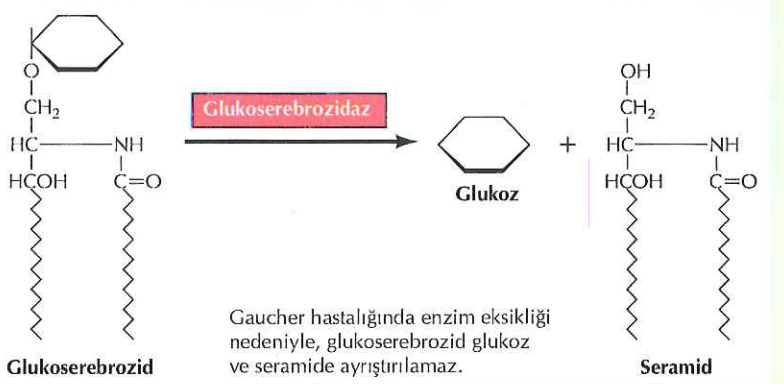
Önleme ve Tedavi

Gaucher hastalığı, var olan bir enzim eksikliğini düzeltmek amacıyla, dışarıdan enzimi yerine koyma tedavisi ile düzeltilebilen hastalıklara iyi bir örnektir. Lizozomal depo hastalıklarının tedavisine bu yaklaşım, ilk olarak 1960'larda Christian deDuve tarafından, dışarıdan verilen enzimlerin endositoz yoluyla hücre içine alınıp lizozomlara taşınabileceği fikri temel alınarak-ileri sürülmüştür. Tip I Gaucher hastalığında, tek hedef hücrenin makrofajlar olması nedeniyle bu yaklaşım özellikle ilgi görmektedir. 1970'lerde, makrofajların hücre yüzeyinde, hücre dışı glikoproteinler üzerinde yer alan mannoz birimlerini bağlayan reseptörler taşıdıkları ve mannoz içeren proteinleri endositoz yoluyla içselleştirdikleri keşfedildi. Bu gözlem, mannoz birimleri eklenerek değiştirilen glukoserebrozidaz'ın, dışarıdan verildiğinde özgül olarak makrofajları hedefleyebileceğini düşündürmüştür. İnsan plasentasından hazırlanan enzim uygun şekilde değiştirilmiş ve klinik çalışmalar, bu yöntemin Gaucher hastalığının tedavisindeki etkinliğini açıkça göstermiştir.

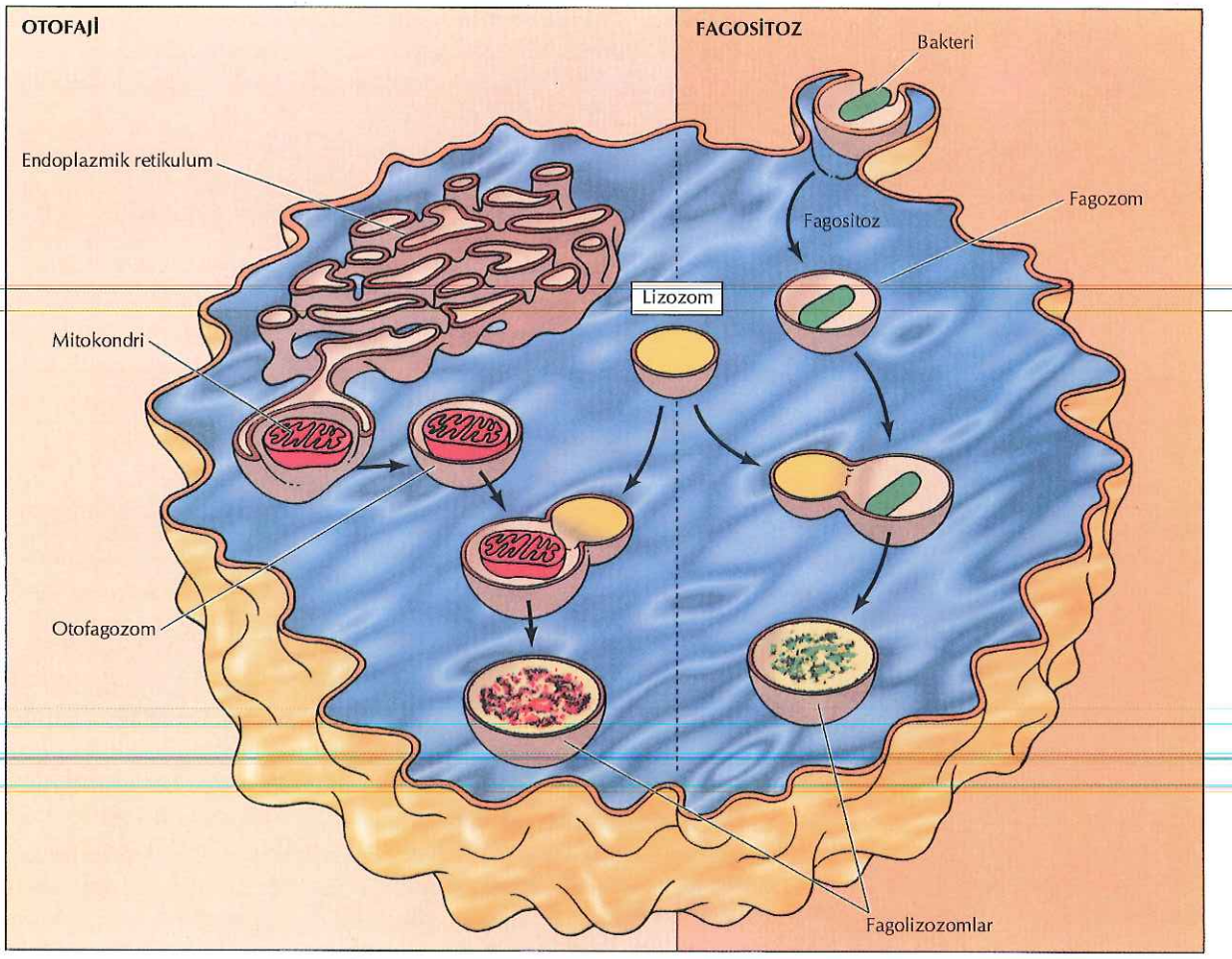
Ne yazık ki, Gauher hastalığı için eksiği yerine koyma tedavisi oldukça pahalıdır: Tek bir hastanın önerilen dozlardaki tedavisinde, sadece enzimin maliyeti yılda 50,000 – 500,000 dolar arasındadır. Tedavinin maliyeti hastaların maddi olanaklarının çok üzerindedir. Bu durum nadir hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların maliyeti konusunda toplumsal içerikli tartışmalara konu olmuştur.

Kaynaklar

Beutler, E. 1996. The cost of treating Gaucher's disease. *Nature Med.* 2:523-524.
Zhao, H. and G.A. Grabowski. 2002. Gaucher disease: prespectives on a prototype lysosomal disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:694-707.



Gaucher hastalığında enzim eksikliği nedeniyle, glukoserebrozid glukoz ve seramide ayrıştırılamaz.



Şekil 9.40 Fagositoz ve otofajide lizozomlar
Fagositozda büyük partiküller (örneğin bakteriler) fagositik vakuollere ya da fagozomlara alınırlar. Otofajide, iç organeller (mitokondri gibi) ER'dan köken alan membran parçaları ile çevrelenerek otofagozomları oluşturur. Hem fagozomlar hem de otofagozomlar lizozomlar ile kaynaşarak içeriklerinin sindirildiği büyük fagolizozomları meydana getirir.

Önceden tartışıldığı gibi asit hidrolazlar *trans* Golgi ağındaki mannoz-6-fosfat reseptörleri tarafından tanınarak, klatrin kaplı veziküllere paketlenen, mannoz-6-fosfat birimleri yoluyla lizozomlara hedeflenirler. Klatrin kılıfın ayrılmasını takiben, bu taşıyıcı veziküller geç endozomlar ile kaynaşır ve asidik iç pH, hidrolazların mannoz-6-fosfat reseptöründen ayrılmasına yol açar. (bkz. Şekil 9.39). Sonuç olarak hidrolazlar endozom lümenine bırakılırken, reseptörler zarda kalır ve Golgi'de tekrar kullanılmak üzere geri dönüştürülür. Başlangıçta endositoz ile alınmış olan molekülleri sindiren asit hidrolazların tümünü edinen geç endozomlar, bundan sonra lizozomlara olgunlaşır.

Fagositoz ve Otofaji

Endositoz yoluyla alınan moleküllerin yıkımına ek olarak, lizozomlar iki farklı yolla gelen materyali de sindirirler: fagositoz ve otofaji (Şekil 9.40). **Fagositozda,** makrofaj gibi özelleşmiş hücreler, bakteri, hücre artıkları ve vücuttan uzaklaştırılması gereken yaşlanmış hücreler gibi büyük partikülleri içlerine alıp parçalarlar. Bu tür partiküller, daha sonra içeriklerinin sindirilmesi için lizozomlarla kaynaşacak olan fagositik vakuoller (**fagozomlar**) içerisine alınır. Bu şekilde oluşmuş

lizozomlar (**fagolizozomlar**), boyut ve şekilleri sindirdikleri içeriğe bağlı olduğundan, oldukça büyük ve farklı yapılarda olabilir.

Lizozomlar ayrıca, hücrenin kendi yapı taşlarının aşamalı dönüşümü anlamında, **otofaji**den de sorumludur (Bölüm 7'de tartışılmıştır). Otofajinin ilk adımı, bir organelin (örn., mitokondri) ER'dan türemiş bir zar ile çevrelenmesi olarak görünüyor. Sonuçta oluşan vezikül (bir **otofagozom**) bir lizozom ile kaynaşır ve içeriği sindirilir (bkz. Şekil 9.40).

ANAHTAR SÖZCÜKLER

endoplazmik retikulum (ER), kaba ER, transisyonel ER, düz ER, salgı vezikülü, salgı yolağı

sinyal dizi, mikrozom, sinyal tanıyan partikül (SRP), srpRNA, SRP reseptörü, translokon sinyal peptidaz

protein disulfid izomeraz, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası, kalneksin, kalretikulin

flipaz

ÖZET

ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Endoplazmik Retikulum ve Protein Salgılanması: Protein sınıflandırılmasında ilk dallanma noktası endoplazmik retikulumdur. Memeli hücrelerinde salgılanan, lizozom veya plazma zarına hedeflenen proteinler, zara bağlı ribozomlarda sentezlenir ve sentez sürerken, kaba ER içerisine aktarılırlar.

Proteinlerin Endoplazmik Retikuluma Hedeflenmesi: Proteinler ER'a, proteine çevrimleri sürerken veya translasyon bitiminde sitozol içerisindeyken hedeflenebilir. Memeli hücrelerinde çoğu protein, zara bağlı ribozomlarda protein çevrimi sürerken ER içine aktarılırlar. Salgılanacak proteinlerin sentezlendiği ribozomlar, polipeptid zincirinin amino ucundaki sinyal dizileri ile endoplazmik retikuluma hedeflenirler. Bu aşamadan sonra, uzayan polipeptid zincirleri, protein kanalları aracılığıyla, ER içine aktarılırlar ve sinyal dizisinin kesilmesiyle lümen içerisinde serbestleşirler.

Proteinlerin ER Zarına Katılması: Plazma zarının veya ER, Golgi aygıtı ve lizozom zarlarının integral proteinleri, öncelikle ER zarına gömülerek yerleşirler. ER lümenine aktarılmak yerine bu proteinler, uzayan polipeptidlerin transferini durduran ve zarı kat eden α-sarmallar aracılığıyla ER zarına çapalanırlar.

ER'da Protein Katlanması ve İşlemlenmesi: Polipeptid zincirleri doğru üç boyutlu yapılarına ER içerisinde katlanırlar. ER ayrıca, N-bağlı glikozillenmenin gerçekleştiği ve GPI çapalarının eklendiği yerdir. Doğru katlanamayan proteinler, salgı yolağından çıkarılarak yıkım için işaretlenirler.

Düz ER ve Lipid Sentezi: ER, ökaryot hücrelerde lipid sentezinin gerçekleştiği başlıca merkezdir. Yağda çözünür ilaçların toksisitesinin giderilmesi ile lipid metabolizmasın aktif olduğu hücrelerde düz ER oldukça yoğun olarak bulunur.

Protein ve Lipidlerin ER'dan Dışarı Çıkışları: Protein ve lipidler, ER'dan Golgi aygıtına veziküller aracılığıyla aktarılır. ER'da yerleşecek proteinler kendilerini, bir geri döngüsel yolak ile Golgi'den ER'a geri gönderecek sinyal dizileri ile işaretlenmişlerdir. Başka hedef diziler de, salgılanacak proteinlerin Golgi'ye gidecek veziküller içerisine seçici olarak paketlenmesini sağlar.

GOLGİ AYGITI

Golgi'nin Organizasyonu: Golgi aygıtı, lipid ve polisakkarid sentezinin yanı sıra, proteinlerin işlemlenmesi ve sınıflandırılmasında görev alır. Proteinler ER'dan *cis* Golgi ağına taşınırlar. Buradan da Golgi aygıtının metabolik açıdan en aktif bölgesini temsil eden Golgi tabakalarına aktarılırlar. Modifiye proteinler, Golgi katmanlarından, sınıflanıp endozom, lizozom, plazma zarı veya hücre dışına gönderilmek üzere veziküllere paketlendikleri, *trans* Golgi ağına aktarılırlar.

Golgi Aygıtı, Golgi kompleksi, *cis* Golgi ağı, Golgi katmanı, *trans* Golgi ağı

Proteinlerin Golgi İçerisinde Glikozillenmesi: Proteinlere ER içerisinde eklenmiş olan N-bağlı oligosakkaridler, Golgi içinde modifiye edilir. Lizozomlara gidecek olan proteinler, özellikle mannoz birimlerinden fosfatlanır ve mannoz-6-fosfat, *trans* Golgi ağından lizozomlara gidecek proteinler için bir hedefleme sinyali olarak işlev görür. Bunlara ek olarak O-bağlı glikozillenme, Golgi içerisinde gerçekleştirilir.

mannoz 6 fosfat, sinyal yaması

Golgi İçindeki Lipid ve Polisakkarid Metabolizması: Golgi aygıtı, glikolipidlerin, sfingomiyelin ve bitki hücre duvarlarındaki kompleks polisakkaridlerin sentez yeridir.

Proteinlerin Golgi Aygıtında Sınıflandırılması ve Dışarı Gönderilmesi: Proteinler *trans* Golgi ağında sınıflandırılıp; salgılanmaya, lizozoma, plazma zarına veya maya ve bitki hücre vakuollerine hedeflenen veziküllere paketlenirler.

apikal bölge, bazolateral bölge, vakuol

VEZİKÜLLE TAŞINMA MEKANİZMASI

Veziküler Taşınmayı Anlamaya Yönelik Deneysel Yaklaşımlar: Veziküler transport mekanizmaları, maya mutantları, hücrelerden bağımsız yapılandırılmış sistemler ve sinaptik vezikül araştırmaları ile aydınlatılmıştır.

sinaptik vezikül

Kargo Seçimi, Kaplayıcı Proteinler ve Veziküler Tomurcuklanma: Veziküllerin sitoplazmik yüzeyleri, vezikül tomurcuklanması ve taşınacak spesifik molekülleri seçen proteinler ile kaplanmıştır.

klatrin kaplı vezikül, COP kaplı vezikül

Vezikül Kaynaşması: Doğru hedef zara vezikülün, zar kaynaşması ile sonuçlanan, bağlanması, transmembran protein çiftleri tarafından düzenlenir.

SNARE hipotezi, Rab

LİZOZOMLAR

Lizozomal Asit Hidrolazlar: Lizozomlar, protein, nükleik asit, polisakkarid ve lipid yıkımına yol açan bir seri asit hidrolaz enzimi barındırırlar. Bu enzimler özellikle lizozom içerisindeki asidik pH'da işlev görürler.

Lizozom, lizozomal depo hastalığı

Endositoz ve Lizozom Oluşumu: Endositoz yoluyla alınan hücre dışı moleküller, Golgi'den gönderilen lizozomal asit hidrolazları alarak lizozoma olgunlaşan, endozomlara aktarılırlar.

Endositoz, endozom

Fagositoz ve Otofaji: Lizozomlar, fagositoz yoluyla alınan büyük partiküllerin yıkımı ile hücrenin kendi yapılarının otofaji yoluyla yavaş sindiriminden sorumludur.

Fagositoz, fagozom, Fagolizozom, otofaji, otofagozom

Sorular

1. Kaba ER → Golgi aygıtı → salgı vezikülleri → salgılanan proteine kadar olan salgı yolunun varlığını gösteren ilk deneysel bulgu neydi?

2. Potansiyel salgı proteinlerini kaba ER'a hedefleyen sinyal dizilerinin varlığı, *in vitro* mRNA translasyon bulguları ile nasıl destekledi?

3. Polipeptid zincirlerinin ER içerisine translasyon-sırasında ve translasyon-sonrasında yar değiştirmenin farklarını, her ikisinin itici güçlerini de anlatarak açıklayınız.

4. Sec61 ER zarındaki protein kanallarının önemli bir bileşenidir. Sec61 mutant maya hücrelerinde, normalde Golgi aygıtında yerleşik bir proteinin kaderi ne olur?

5. Glikoproteinlerin karbohidrat grupları neden her zaman hücre dış yüzeyinde lokalize olur?

6. BiP benzeri bir ER proteininde bulunan KDEL sekansının mutasyonu veya delesyonunun etkisi ne olabilir? Bu etki KDEL reseptör proteinini inaktive eden bir mutasyonun etkisiyle ne gibi benzerlikler veya farklılıklar taşır.?

7. Lizozomal bir protein (örn., lizozomal hidrolazlardan biri) lizozoma ne şekilde hedeflenir?

8. Normalde sitozolde lokalize olan bir proteine, onu lizozoma hedefleyen bir sinyalin eklenmesi ne gibi sonuçlar doğurur? Aynı durum, normalde salgılanan bir proteinin yerleşimini nasıl etkiler?

9. Hücrelerin mannoz 6-fosfat birimlerini oluşturan enzimin hatalı olduğu I-hücre hastalığında lizozomal asit hidrolazların kaderi ile ilgili beklentileriniz ne olur?

10. Hangi sürecin sonucunda glikolipid ve sfingomiyelin, plazma zarı çift tabakasının iç yarısına değil de dış yarısına yerleşir?

11. Golgi sarnıçları arasındaki veziküler trafik, hangi deneysel bulgularla gösterildi?

12. Lizozomlarında glikoserebrozid birikimi olan bir hasta kliniğinize gelir. Tanınız ne olur? Maliyetin önemli olmadığı koşullarda nasıl bir tedavi önerirsiniz?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Endoplazmik Retikulum

Abeijon, C. and C. B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends. Biochem. Sci.* 17:32-36.[R]

Antonny, B. and R. Schekman. 2001. ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 438-443. [R]

Beckmann, R., D. R. Bubeck, P. Grassuci, A. Penczek, G. Verschoor, G. Blobel and J. Frank. 1997. Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* 278: 2123-2130. [P]

Bishop, W. R. and R. M. Bell. 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: Biosynthesis, transmembrane movement, and intracellular translocation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:580-610. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across the membrane. I. Presence of proteolytically processed and un-processed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67:835-851. [P]

Ellgaard, L. and A. Helenius. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 431-437. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62:121-138. [R]

Fiedler, K. and K. Simons. 1995. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81: 309-312. [R]

Glick, B. S. 2001. ER export: more than one way out. *Curr. Biol.* 11: R361-R363. [R]

Haucke, V. 2003. Vesicle budding: A coat for the COPs. *Trends Cell Biol.* 13: 59-60. [R]

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 315-343. [R]

Matlack, K. E. S., B. Misselwitz, K. Plath and T. A. Rapoport. 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-α factor across the ER membrane. *Cell* 97: 553-564.] P I

Menon, A. K. 1995. Flippases. *Trends Cell Biol.* 5: 355-360. [R]

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358. [R]

Powers, T. and P. Walter. 1997. A ribosome at the end of the tunnel. *Science* 278: 2072-2073. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64:563-591. [R]

Golgi Aygıtı

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281-291. [P]

Barr, F. A. 2002. The Golgi apparatus: Going round in circles? *Trends Cell Biol.* 12: 101-104. [R]

Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler and D. E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:517-568. [R]

Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel. 1992. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613-616. [R]

Conibear, E. and T. H. Stevens. 1995. Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins. *Cell* 83: 513-516. [R]

Driouich, A., L. Faye and L. A. Staehelin. 1993. The plant Golgi apparatus: A factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 210-214. [R]

Farquhar, M. G. and G. E. Palade. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8: 2-10. [R]

Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99: 189-196. [P]

Glick, B. S. 2002. Can the Golgi form *de novo? Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:615-619. [R]

Hirschberg, C. B. and C. B. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulLim and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63-87. [R]

Kirchhausen, T. 2002. Clathrin adaptors really adapt. *Cell* 109: 413-416. [R]

Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-664. [R]

Mostov, K., M. B. A. ter Beest and S. J. Chapin. 1999. Catch the μ1B train to the basolateral surface. *Cell* 99:121-122. [R]

Pearse, B. M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97: 93-98. [P]

Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 355:409-415. [R]

Tooze, S. A., G. J. Martens and W. B. Huttner. 2001. Secretory granule biogenesis: Rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11:116-122. [R]

Varki, A. 1998. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 8:34-40. [R]

Veziküler Transport Mekanizması

Balch, W. E., W. G. Dunphy, W. A. Braeli and J. E. Rothman. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39: 405-416. [P]

Chen, Y. A. and R. H. Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 98-106. [R]

Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:721-730. [R]

Jahn, R., T. Lang and T. C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112:519-533. [R]

Novick, P. and P. Brennwald. 1993. Friends and family: The role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75: 597-601. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21:205-215. [P]

Pelham, H. R. 2001. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* 11: 99-101. [R]

Pfeffer, S. 2003. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* 112: 507-517.[R]

Rizo, J. and T. C. Sudhof. 2002. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:641-653. [R]

Segev, N. 2001. Ypt and Rab GTPases: Insight into functions through novel interactions. *Curr. Opm. Cell Biol.* 13: 500-511. [R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324. [P]

Lizozomlar

Dunn, W. A., Jr. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4:139-143. [R]

Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar (H^+)-ATPases. *J. Biol. Chem.* 274:12951-12954. [R]

Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 266: 21327-21330. [R]

Ghosh, P., N. M. Dahms and S. Kornfeld. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 202-213. [R]

Kornfeld, S. and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257-280. [R]

Bölüm 10 Biyoenerjetik ve Metabolizma

Mitokondri, Kloroplast ve Peroksizomlar

Mitokondriler 399

Oksidatif Fosforilasyon Mekanizması 408

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler 415

Fotosentez 422

Peroksizomlar 426

ANAHTAR DENEY: Kemiozmotik Teori 412

MOLEKÜLER TIP: Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtımsal Optik Nöropatisi 406

PROTEİN DAĞILIMI VE TAŞINMASIYLA İLİŞKİLERİNİN YANI SIRA, sitoplazmik organeller çeşitli metabolik aktivitelerin yer aldığı özel bölmeler oluştururlar. Metabolik enerji üretimi tüm hücrelerin en önemli aktivitesidir ve sitoplazmik iki organel, özel olarak, enerji metabolizmasına ve ATP üretimine ayrılmıştır. Mitokondriler, lipid ve karbohidratların yıkımından elde edilen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludur, kloroplastlar güneş ışığından yakalanan enerjiyi, ATP'yi ve CO_2 ile H_2O dan karbohidratların sentezlenmesi için gerekli redükleyici gücü oluşturmak üzere kullanır. Bu bölümde tartışılan üçüncü organel, peroksizom, yağ asitlerinin yıkımını ve fotosentez yan ürünlerinin metabolizmasını da kapsayan çeşitli farklı metabolik yolaklarla ilgili enzimleri içerir.

Mitokondri, kloroplast ve peroksizom, önceki bölümde ele alınan organellerden sadece işlevleriyle değil, yapısal oluşum mekanizmalarıyla da ayrılırlar. Peroksizom, mitokondri ve kloroplasta gidecek proteinler, zara bağlı ribozomlarda sentezlenip endoplazmik retikuluma aktarılmak yerine, sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenerek hedef organele, tamamlanmış polipeptid zinciri olarak aktarılırlar. Mitokondri ve kloroplast, organel içerisinde transkribe olup proteine çevrilen bazı genler içeren, kendilerine ait genoma sahiptirler. Bu nedenle, bu bölümde ele alınan sitoplazmik organellere protein dağıtımı, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozom ve plazma zarını birbirine ilişkilendiren veziküler transport yolağından oldukça farklıdır.

Mitokondriler

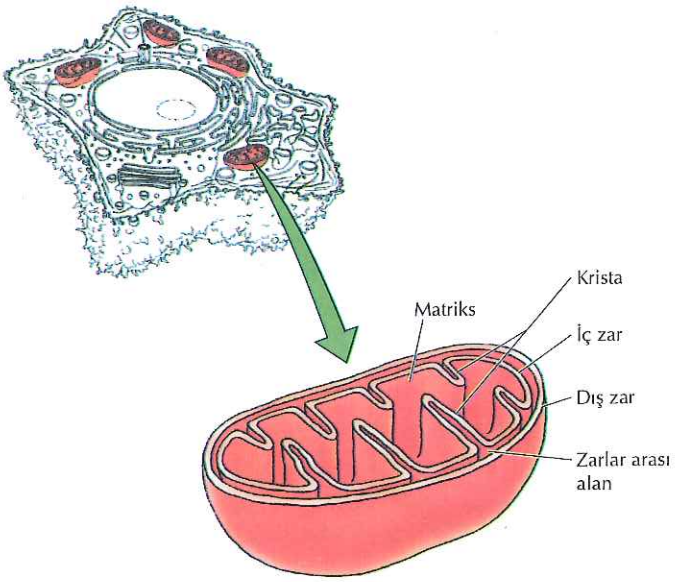
Mitokondriler ökaryot hücrelerde metabolik enerjinin üretiminde kritik bir role sahiptir. Bölüm 2'de gözden geçirildiği gibi, lipid ve karbohidratların yıkımından elde edilen ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle ATP'ye dönüştürülen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludurlar.

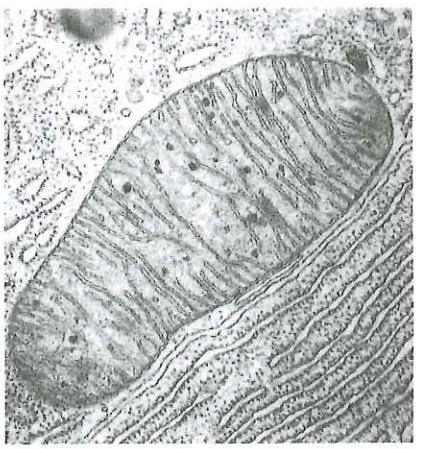
Mitokondri proteinlerinin çoğu serbest sitozolik ribozomlarda sentezlendikten sonra, hedefleyen özel sinyaller aracılığıyla organele alınırlar. Ayrıca mitokondri, daha önce tartışılmış olan sitoplazmik organeller arasında, tRNA'ları, rRNA'ları ve bazı mitokondriyal proteinleri kodlayan kendine ait bir DNA'ya sahip olmasıyla benzersizdir. Mitokondrilerin yapılanması böylece, nükleer genom tarafından kodlanan ve sitozolden alınan proteinlerle birlikte, kendi genomları tarafından kodlanan ve organel içinde sentezlenen proteinleri de gerektirir.

Mitokondri Organizasyonu ve İşlevi

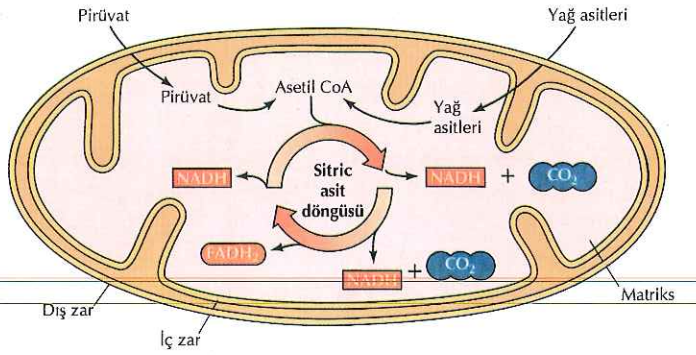
Mitokondriler, bir intermembran alanla birbirinden ayrılmış iç ve dış mitokonri zarlarından oluşan bir çift- zar sistemiyle çevrilidirler (Şekil 10.1). İç zar organelin içine (ya da **matriks'e**) doğru uzanan çok sayıda kıvrımlar (**krista**) oluşturur. Matriks ve iç zar mitokondrinin en önemli işlevsel bölümleri olmak üzere, bu bileşenlerin her biri farklı işlevsel roller üstlenmiştir.

Matriks, mitokondriyal genetik sistemlerle birlikte ana oksidatif metabolizma tepkimelerinden sorumlu enzimleri içerir (Şekil 10.2). Bölüm 2'de görüldüğü gibi, hayvan hücrelerinde glukoz ve yağ asitlerinin oksidatif yıkımı başlıca metabolik enerji kaynağıdır. Glukoz metabolizmasının, glukozun piruvata dönüştürüldüğü başlangıç evreleri (glikoliz) sitozolde gerçekleşir (bkz. Şekil 2.32). Daha sonra piruvat mitokondriye aktarılır ve burada tümüyle CO_2'e yükseltgenmesiyle glukoz metabolizmasından büyük miktarda kullanılabilir enerji (ATP) elde edilir. Bu, öncelikle piruvatın, daha sonra sitrik asit döngüsü yoluyla CO_2'e yıkılacak olan asetil CoA'ya oksitlenmesini gerektirir (bkz.Şekil 2.33 ve 2.34). Yağ asitlerinin oksidasyonu ile de asetil CoA elde edilir (bkz. Şekil 2.36) ve benzer şekilde mitokondri içerisinde sitrik asit döngüsüyle metabolize edilir. Sitrik asit döngüsü enzimleri (mitokondri matriksinde bulunur) hem karbohidratların hem de yağ asitlerinin oksidatif yıkımında temel oyunculardır.





Şekil 10.1 Bir mitokondrinin yapısı
Mitokondriler iç ve dış zarlardan oluşan bir çift-zar sistemiyle sınırlanmıştır. İç zarın kıvrımları (krista) matriksin içine doğru uzanır. (Mikrograf K.R. Porter/ Photo Researchers, Inc.)



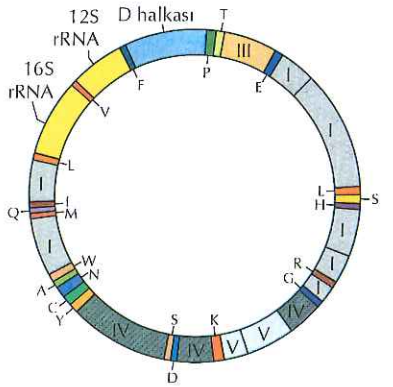
Şekil 10.2 Mitokondri matriks metabolizması
Pirüvat ve yağ asitleri sitozolden alınır ve mitokondri matriksinde Asetil CoA'ya dönüştürülür. Asetil CoA daha sonra, oksidatif metabolizmanın temel yolağı olan sitrik asit döngüsüyle CO_2'e oksitlenir.

Asetil CoA'nın CO_2'e oksidasyonu NAD^+ ve FAD'ın, sırasıyla, NADH ve $FADH_2$'ye indirgenmesiyle eşleşir. Oksidatif metabolizmadan türetilen enerjinin çoğu, mitokondri iç zarında gerçekleşen oksidatif fosforilasyon süreciyle (izleyen bölümde detaylı olarak tartışılacak) üretilir. NADH ve $FADH_2$'den çıkan yüksek-enerjili elektronlar zarda yerleşik bir dizi taşıyıcıdan geçerek moleküler oksijene aktarılır. Bu elektron taşınma reaksiyonlarından çıkan enerji, zarın iki yanında oluşan bir proton gradientinde depolanmış potansiyel enerjiye dönüştürülür ve daha sonra bu, ATP sentezini beslemek için kullanılır. Böylece, mitokondri iç zarı başlıca ATP üretim bölgesini simgeler ve bu kritik görev, yapısından kaynaklanır. Öncelikle, yüzey alanı kristaları oluşturan kıvrılmalarla önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, mitokondri iç zarı alışılmamış derecede yüksek oranda (%70'den fazla) protein içerir ki, bunlar oksidatif fosforilasyonun yanı sıra, metabolitlerin (örn., piruvat ve yağ asitleri) sitozol ile mitokondri arasında taşınımı için de gereklidir. Bunlardan başka, iç zar birçok iyon ve küçük molekül için geçilemezdir (impermeable)–oksidatif fosforilasyonu sağlayan proton gradientinin kalıcılığı bakımından kritik bir özellik.

İç zarın aksine mitokondri dış zarı küçük moleküller için yüksek oranda geçirgendir. Bunun nedeni, 1,000 dalton'dan küçük moleküllerin serbest difüzyonuna olanak veren kanalları oluşturan ve porin olarak adlandırılan proteinler içermesidir. Bu nedenle, zarlar arası alanın bileşimi iyonlar ve küçük moleküller yönünden sitozole benzer. Sonuç olarak, mitokondri iç zarı küçük moleküllerin sitozolden matrikse geçişine işlevsel bir engel oluşturur ve oksidatif fosforilasyonu yürüten proton gradientinin devamlılığını sağlar.

Mitokondrinin Genetik Sistemi

Mitokondriler hücre genomundan ayrı ve farklı olan, kendilerine ait genetik sistem içerirler. Bölüm 1'de incelendiği gibi mitokondrilerin, kendilerinden daha büyük hücreler içerisinde canlılıklarını koruyarak (**endosimbiyozis**) bir simbiyotik ilişki geliştiren bakterilerden evrimleştikleri düşünülmektedir. Bu hipotez yakın zamanda, mitokondri genomu ile *Rickettsia prowazekii* bakterisininki arasında çarpıcı benzerlikleri açığa çıkaran DNA dizi analizleriyle kanıtlanmıştır. Rickettsia mitokondriler gibi yalnızca ökaryot hücreler içerisinde çoğalabilen hücre içi parazitlerdir. Benzer yaşam tarzlarıyla tutarlı olarak Rickettsia ve mitokondrilerin genomik DNA dizinleri, bugünkü mitokondrilerin genetik sistemlerinin köken aldığı ortak bir atayı belirtir.



Şekil 10.3 İnsan mitokondri genomu
Genom, solunum kompleksi bileşeni I, III, IV ya da V olarak belirtilen, 13 protein- kodlayan dizi içerir. Genomda ayrıca, 12S ve 16S rRNA genleri ve uygun oldukları amino asidin tek-harf şifresiyle belirtilen 22 tRNA geni bulunur. Genomun "D halkası" olarak simgelenen bölgesi bir DNA replikasyon orijini ve transkripsiyon promotör dizileri içerir.

Mitokondrilerin genomları, bakterilerinki gibi, genellikle çembersel DNA molekülleridir ve organel başına çok sayıda kopyaları bulunur. Büyüklükleri farklı türler arasında çok değişkendir. İnsan ve birçok diğer hayvan mitokondrilerinin genomları yalnızsa 16kb iken, mayada (yaklaşık 80kb) ve bitkilerde (200kb den fazla) çok daha büyük mitokondri genomları bulunur. Ancak, bu daha büyük mitokondri genomlarına kodlamayan dizinler hakimdir ve önemli derecede daha fazla genetik bilgi içerdikleri söylenemez. Örneğin, dizisi belirlenmiş en büyük mitokondri genomu *Arabidopsis thaliana* bitkisininkidir. *Arabidopsis* mitokondri DNA'sı yaklaşık olarak 367kb olmasına karşın, sadece 32 protein kodlar: insan mitokondri DNA'sının kodladığının iki katından sadece biraz fazla. En büyük mitokondriyal gen sayısı, bir protozoa olan *Reclinomas americana* mitokondrisinin DNA'sında bulunur, 69kb dır ve 97 gen içerir. *Reclinomas* mitokondrisinin genomu mitokondrilerin evrimleştiği bakteri genomuna, sadece oksidatif fosforilasyon sisteminin başlıca gereksinimi olan az sayıda proteini kodlayan günümüz mitokondrilerinin genomlarına kıyasla, daha yakın benzerlik göstermektedir. Mitokondri genomları ayrıca, bu protein-kodlayan dizinlerin mitokondrilerin içerisinde translasyonu için gerekli ribozomal RNAları ve taşıyıcı RNA'ların çoğunu da kodlar. Diğer mitokondri proteinleri, atasal mitokondri genomundan nükleusa aktarıldığı sanılan nükleer genler tarafından kodlanır.

İnsan mitokondri genomu elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonla ilişkili 13 protein kodlar (Şekil 10.3). İnsan mitokondri DNA'sı ayrıca, organel genomunda kodlanan proteinlerin sentezi için gerekli olan 16S ve 12S rRNA'lar ile 22 tRNA kodlar. Bakteri ribozomlarında üç rRNA (23S,16S ve 5S) bulunmasına karşın, hayvan ve maya mitokondri ribozomlarında RNA bileşeni olarak yalnızca iki rRNA bulunur. Bitki mitokondri DNA'ları ise, 5S'lik üçüncü bir rRNA kodlar. Hayvan mitokondrilerinde tRNA'ların tümü organel tarafından kodlanırken, bitki ve protozoaların mitokondrileri organel genomu yanı sıra nükleer genomdan kodlanan tRNA'ları alıp kullanmalarıyla farklılık gösterirler.

Mitokondri genomunca kodlanan az sayıdaki tRNA mitokondri genetik sisteminin önemli bir özelliğine ışık tutar- hem prokaryot hem de ökaryot hücreler tarafından kullanılan "evrensel" genetik koddan farklı, biraz değişik bir genetik kod kullanımı (Tablo 10.1). Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, 64 üçlü kodon olasılığı vardır ve bunlardan 61 tanesi proteinlerin yapısına giren 20 değişik amino asidi kodlar (bkz.Tablo 3.1). Prokaryot ve ökaryot hücrelerde tRNA'ların çoğu mRNA'da birden fazla kodonu tanıyabilir. Bunun nedeni, tRNA'daki antikodon ile belirli bir komplementer kodonun üçüncü pozisyonu arasında hatalı eşleşmeye olanak veren "wobble"dır (bkz.Şekil 7.3). Yine de, wobble kurallarına göre evrensel kodu çevirmek için en az 30 farklı tRNA gerekir. İnsan mitokondri DNA'sı ise sadece 22 tRNA çeşidi kodlar ve bunlar mitokondri mRNA'larının translasyonunda kullanılan yegane tRNA'lardır. Bu olgu, tRNA antikodonundaki U'nun, dört kodonun tek bir tRNA tarafından tanınmasını sağlayacak şekilde, mRNA'nın üçüncü kodon pozisyonundaki dört bazdan herhangi biriyle eşleşebilmesi sayesinde gerçekleşir. Ayrıca, mitokondride bazı kodonlar evrensel koddan farklı amino asitleri belirtirler.

TABLO 10.1 Evrensel ve Mitokondriyal Genetik Kodlar Arasındaki Farklar

Kodon	Evrensel kod	İnsan Mitokonrisi kodu
UGA	DUR	Trp
AGA	Arg	DUR
AGG	Arg	DUR
AUA	Ile	Met

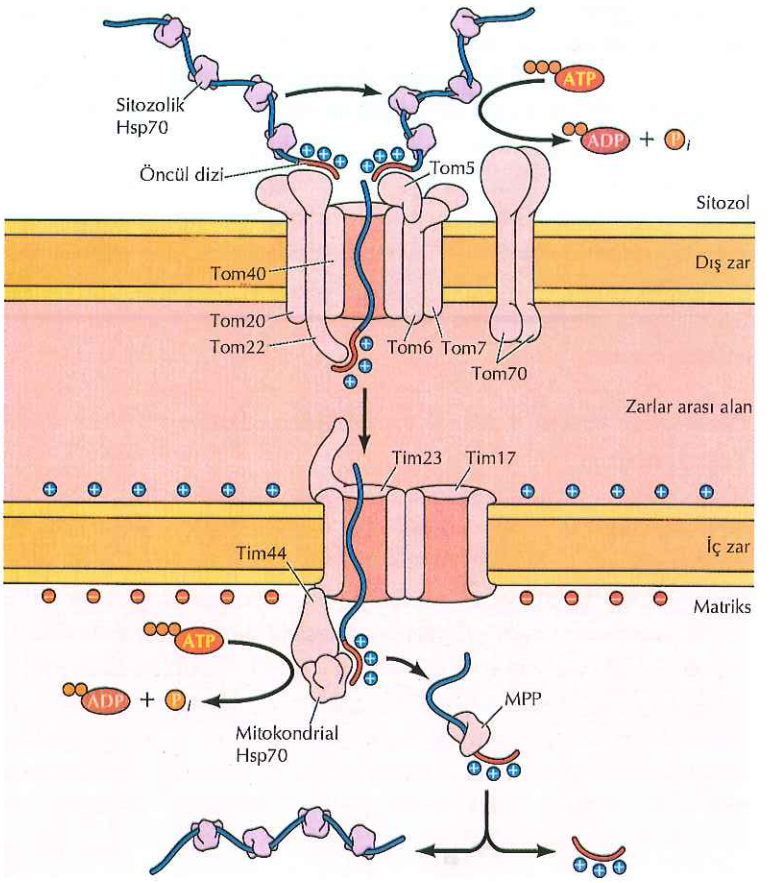
Maya ve bitki mitokondrilerinde evrensel koddan farklı diğer kodonlar bulunur.

Nükleer genom DNA'sı gibi mitokondri DNA'sı da, genellikle organele zarar veren mutasyonlardan etkilenir. Döllenmiş yumurtadaki mitokondrilerin hemen hepsi, spermden değil oositten kazanıldığı için, mitokondri DNA'sındaki germ-hattı mutasyonlar bir sonraki nesle anne tarafından aktarılır. Bu tip mutasyonlar bazı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, körlükle sonuçlanan bir hastalık olan Leber'in kalıtımsal optik nöropatisi elektron transport zincirinde yer alan bileşikleri kodlayan mitokondri genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, bireyin yaşam sürecinde mitokondri DNA'larında mutasyonların birikmesinin yaşlanmaya katkısı olduğu belirtilmektedir.

Dışarıdan Protein Alımı ve Mitokondrinin Yapılanması

Mitokondri çevrim düzeneğindeki RNA bileşiklerinin (rRNA ve tRNA'lar) aksine, çoğu mitokondri genomu, DNA replikasyonu, transkripsiyon ya da translasyon için gerekli proteinleri kodlamaz. Bunun yerine, replikasyon ve mitokondri genlerinin ekspresyonu için gerekli proteinleri kodlayan genler nükleusda bulunur. Nükleus ayrıca, oksidatif fosforilasyon için gerekli bir çok mitokondri proteinini ve mitokondri metabolizmasında rol alan enzimlerin (örn; sitrik asit döngüsü enzimleri) tümünü kodlayan genleri içerir. Bu genler tarafından kodlanan yaklaşık 1,000 protein (mitokondri proteinlerinin %95 inden fazlası) serbest sitoplazmik ribozomlarda sentezlenir ve tamamlanmış polipeptid zincirleri halinde mitokondriye alınır. Mitokondrinin çift zar yapısı nedeniyle proteinlerin içeri alınması, polipeptidlerin tek zardan aktarılmasına kıyasla çok daha karmaşıktır. Matriksi hedefleyen moleküller hem dış hem de iç mitokondri zarlarını geçmek zorunda iken, diğer bazı proteinler organel içerisindeki ayrı bölmelere (örn; zarlar arası alan) dağıtılmalıdır.

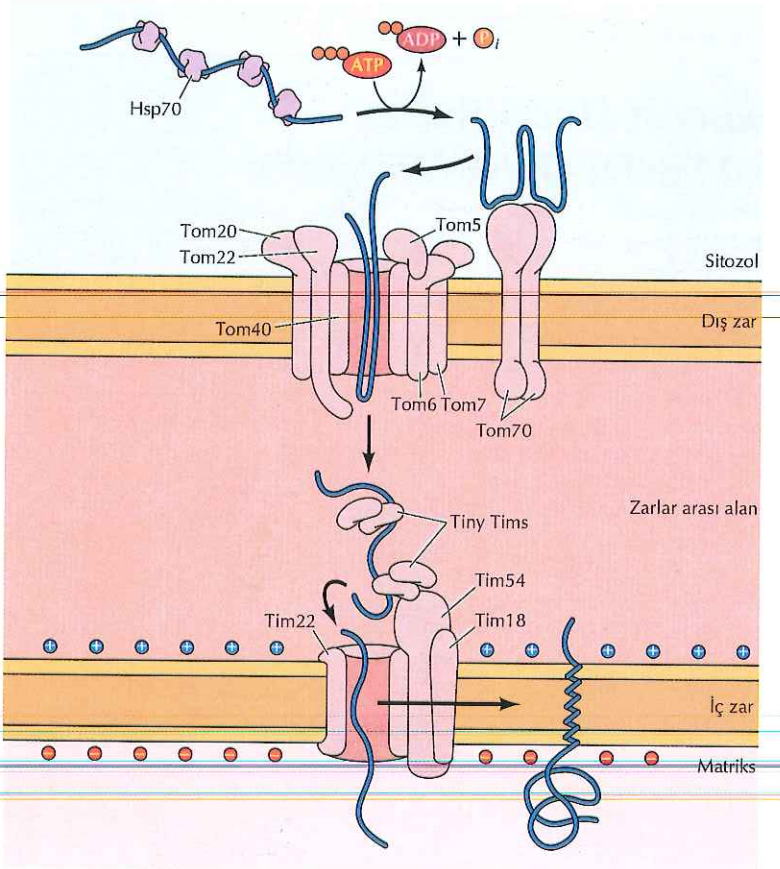
Proteinlerin matrikse alınımı, mitokondride protein dağılımının en iyi anlaşılan konusudur (Şekil 10.4). Bir çok protein, mitokondriye 20-35 amino asitlik amino-ucu dizinleriyle (**öncül diziler** olarak adlandırılır) hedeflenir, organele alınım sonrasında bunlar proteolitik kesimle uzaklaştırılırlar. İlk kez Gottfried Schatz tarafından tanımlanan mitokondri protein öncül dizileri, genellikle amfipatik α sarmal yapısında olup, çok sayıda pozitif yüklü amino asit içerir. Dışarıdan protein alımında ilk aşama, bu öncül dizilerin mitokondri yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasıdır. Bu reseptörler, dış zardan translokasyonu yönlendiren protein kompleksin (**Tom kompleksi** ya da dış zar translokazı) bir parçasıdır. Her bir Tom proteini molekül ağırlığına göre simgelenir, buna göre reseptörler Tom22, Tom20 ve Tom5 olarak adlandırılır. Proteinler bu reseptörlerden Tom40 geçit proteinine aktarılarak dış zardan geçirilir. Proteinler daha sonra iç zardaki ikinci bir protein komplekse (**Tim kompleksi** ya da iç zar translokazı olarak adlandırılan iki kompleksten birine) aktarılır. Öndizi taşıyan proteinler Tim23 kompleksi aracılığıyla iç zarı geçerler. Sürekli protein translokasyonu, elektron aktarımı sırasında iç zarın iki yanında oluşturulan bir elektro kimyasal potansiyel gerektirir. Bu bölümün bir sonraki kısmında tartışıldığı gibi, yüksek enerjili



Şekil 10.4 Mitokondri matriks proteinlerinin içeri alınması
Proteinler, pozitif yüklü amino asitler içeren amino-ucu öncül dizileri sayesinde mitokondri dış zarındaki Tom kompleksine yönlendirilir. Öncül dizi önceTom20 ve Tom22'ye bağlanır, daha sonra Tom5'e ve geçiş kanalı Tom40'a aktarılır. Dış zardan geçiş sonrasında öncül dizi, Tom22'nin zarlar arası bölümüne bağlanır ve iç zardaki Tim23'e verilir. Matriksde Tim44 ile ilişkili bir Hsp70 şaperonu, ATP hidrolizini kullanarak ve bir dişli çark mandalı gibi davranarak proteini iç zardan geçirir. Mitokondri matriksinde kalacak olan proteinlerin çoğunda öncül dizi mitokondri matriksi işlemci peptidazı (MPP) tarafından uzaklaştırılır ve protein katlanmasına yardımcı olacak Hsp70 proteinlerine bağlanır.

elektronların NADH ve $FADH_2$'den moleküler oksijene taşınması, mitokondri matriksindeki protonların zarlar arası alana aktarılmasıyla eş zamanlı yürür. Protonlar yüklü partiküller olduğundan bu aktarım, matriks negatif olacak şekilde, iç zarın iki yanında bir elektrik potansiyeli geliştirir. Dışarıdan protein alımı sırasında bu elektrik potansiyeli, pozitif yüklü öncül dizinin translokasyonunu sağlar.

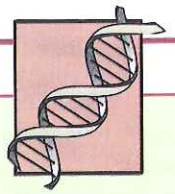
Mitokondri zarından taşınabilmesi için proteinlerin kısmen de olsa katlanmamış olmaları gerekir. Bu nedenle, mitokondriye protein alımı, taşımada görevli zar proteinleri yanı sıra moleküler şaperonları da gerektirir (bkz. Şekil 10.4). Sitozolik tarafta Hsp 70 ailesinden şaperonlar proteinlerin tam katlanmasını engelleyerek mitokondri zarına girebilmelerini sağlar. İç zarı geçen katlanmamış polipeptid zincirleri, Tim 23 kompleksiyle ilişkili ve proteinin alımını yinelenen ATP hidrolizleriyle düzenleyen, bir dişli çark mandalı gibi çalışan diğer bir Hsp 70 şaperonu tarafından tutulur. Çoğunlukla bunu, ön dizinin **matriks işlemci peptidazı (MPP)** tarafından kesilmesi ve polipeptidin, katlanmasını denetleyecek olan matriks Hsp 70 şaperonu tarafından tutulması izler. Bazı polipeptidler daha sonra Hsp 60 ailesinden bir şaperona (şaperonin, bkz. Şekil 7.21) aktarılırlar ki, burada proteinin ekstra katlanması gerçekleşir. Polipeptid zincirlerinin moleküler şaperonlarla bağlantısı ATP bağımlıdır, o halde protein alımı, iç zarın iki yanında elektrik potansiyeli yanı sıra, mitokondrinin hem içinde hem de dışında ATP gerektirmektedir.



Şekil 10.5 Küçük molekül taşıyan proteinlerin mitokondri iç zarına yerleşmesi
Bu proteinler N-ucu öncül diziler yerine iç sinyal dizilerine sahiptir. İç sinyaller, proteini Tom40 geçiş kanalına aktaracak olan Tom70 reseptörlerince tanınır. Zarlar arası alanda protein, kendisini iç zardaki Tim22 kompleksine taşıyacak olan küçük, hareketli Tim proteinleri, "minik Tim"lerle bağlanır. Minik Tim proteinleri, proteini önce Tim54'e daha sonra Tim22 geçiş kanalına aktarır. Proteinin içindeki aktarımı- durdur sinyali geçişi durdurur ve protein yana doğru, mitokondri iç zarına geçer.

Yukarıda belirtildiği gibi, bazı mitokondri proteinleri matrikse değil, dış zara, iç zara ya da zarlar arası alana hedeflenir, ki bu proteinleri uygun mitokondri bölgesine yönlendirecek ek mekanizmalara gereksinim vardır. İç zardaki proteinlerin çoğu küçük molekül taşıyıcılardır ve mitokondri ile sitozol arasında nükleotid ve iyon değiş tokuşunu gerçekleştirirler. Bu proteinler ön dizi içermezler, bunun yerine molekül içinde, çok sayıda, mitokondriye taşınma sinyaline sahiptirler. Sonuç olarak, Tom 20 ve Tom 22 tarafından tanınmazlar. Onun yerine, bu iç zar proteinleri mitokondri dış zarındaki diğer bir reseptör (Tom 70) tarafından tanınırlar ve daha sonra Tom 40 kanalıyla zardan geçirilirler (Şekil 10.5). Zarlar arası alanda proteinler farklı bir Tim kompleksi, Tim22 kompleksinin hareketli elemanları tarafından tanınır. Bu küçük Tim proteinleri ("minik Tim" olarak adlandırılır) hem şaperon hem de mekik proteini olarak görev yaparlar ve proteinlere Tim22'ye kadar eşlik ederler. Daha sonra proteinlerin bir kısmı Tim22 içerisinden aktarılırken, yapılarındaki 'aktarımı-durdur' sinyali Tim22'den yana doğru ayrılmalarına ve iç zara yerleşmelerine neden olur.

Dış zar, iç zar ya da zarlar arası alanda yerleşecek olan diğer proteinler hem bir öncül diziye hem de iç sinyal dizilerine sahiptirler. Öncül dizileri bulunması nedeniyle, dış zardaki Tom20 ve Tom22 reseptörleri tarafından tanınırlar ve Tim23 kanalıyla iç zardan geçirilirler (Şekil 10.6). Bu proteinlerden bazıları Tom kompleksini, yana, dış zarın içine doğru terk ederler, diğerleri dış zardan geçerler



MOLEKÜLER TIP

Mitokondri Hastalıkları: Leber'in Kalıtımsal Optik Nöropatisi

Hastalık

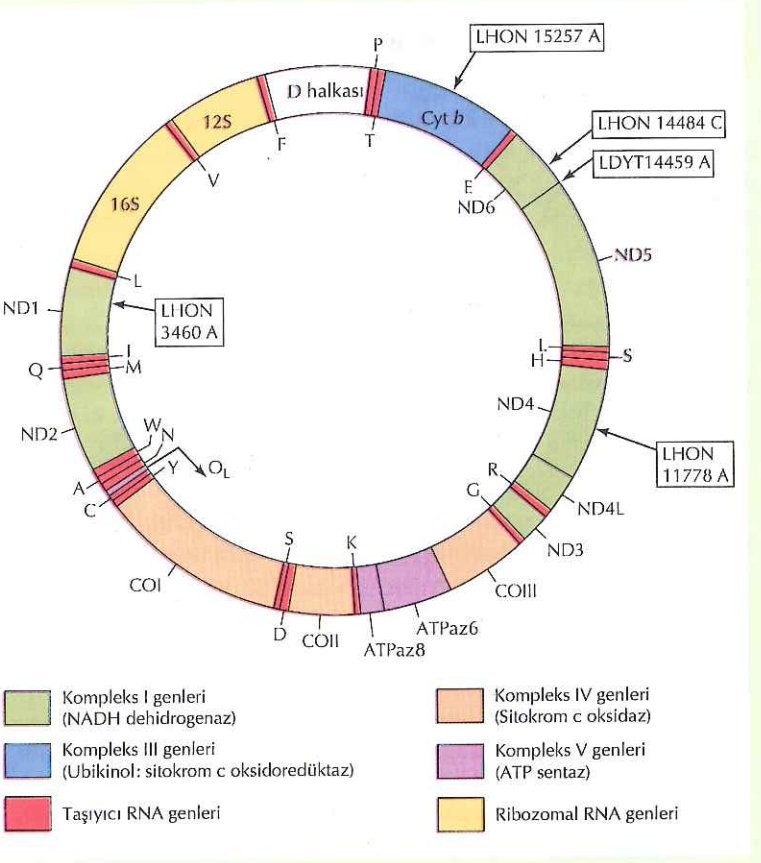
Leber'in kalıtımsal optik nöropatisi (LHON), optik sinirlerin dejenerasyonu nedeniyle körlükle sonuçlanan, nadir kalıtılan bir hastalıktır. Görme kaybı genellikle 15 ile 35 yaşlar arasında ortaya çıkar ve genellikle hastalığın tek belirtisidir. LHON nedeni olan genetik bozukluğu alan tüm bireyler hastalığı geliştirmez ve dişiler erkeklerden daha düşük sıklıkta etkilenirler. Erkekleri etkileme eğilimi LHON'un bir X-e bağlı hastalık olduğu fikrini verebilir. Ancak durum farklıdır, çünkü erkekler LHON'u hiçbir zaman çocuklarına aktarmazlar. Aksine LHON kalıtımı tamamen anne geçişlidir. Bu özellik, döllenmiş yumurtanın sitoplazmasının hemen, hemen tümüyle oositten edinilmesi nedeniyle, LHON'un nüklear değil sitoplazmik kalıtılmasının sonucudur.

Moleküler ve Hücresel Temel

Douglas Wallace ve arkadaşları 1988'de LHON hastalarının mitokondri DNA'sında bir mutasyon tanımladılar. Bu mutasyon (11778. baz çiftinde) elektron taşıma zincirindeki kompleks I'in (NADH dehidrogenaz) altbirimlerinden birini etkilemekte ve arjinin yerine histidin girmesine neden olmaktadır. Tüm LHON olgularının yaklaşık yarısında 11778 mutasyonu görülür. Mitokondri DNA'sındaki diğer üç mutasyon da LHON'un esas nedeni olarak belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan ikisi kompleks I'in diğer alt birimlerini etkilerken, üçüncüsü kompleks III'ün bileşeni olan sitokrom *b*'yi (şekle bakınız) etkiler. Hep birlikte, bu dört mutasyon LHON olgularının %80'inden fazlasında etkilidir. Kompleks I'in alt birimini etkileyen beşinci bir mutasyon (14459. baz çiftinde) ise, ya LHON ya da kas hastalıklarına neden olabilir.

LHON nedeni olan mutasyonlar mitokondrinin, oksidatif fosforilasyonu sürdürme ve ATP oluşturma kapasitesini düşürür. Bunun en büyük etkisi oksidatif fosforilasyona en fazla gereksinim duyan dokularda görüleceğinden, mitokondri bileşenlerindeki hatalar, sistemik hastalıktan ziyade belli dokularda klinik belirtilere yol açar. Merkezi sinir sistemi (beyin ve optik sinir dahil) oksidatif metabolizmaya en yüksek düzeyde gereksinim duyar ki bu durum, LHON'dan sorumlu mitokondri DNA'sı mutasyonlarının neden olduğu öncelikli klinik belirtinin körlük olması ile uyumludur.

Anlaşılacağı gibi, LHON mutasyonlarının kalıtımı her zaman hastalık gelişimine yol açmaz, mutasyonu taşıyan dişilerin %10'u ve erkeklerin %50'si görme kaybına uğrar. LHON mutasyonu taşıyanlar arasında hastalığın görülme oranındaki bu düşüklüğü açıklayabilecek faktörlerden biri, her hücrede mitokondri DNA'sının, normal ve mutant mitokondrilerin karışımı şeklinde binlerce kopyasının bulunuşudur. Hücre bölünmesi sırasında bu mitokondriler yavru hücrelere rastlantısal olarak dağılır, böylece hücre bölündükçe mitokondri populasyonu değişir ve sonuçta, daha az ya da



LHON mutations in mitochodrial DNA.

daha çok oranda mutant organele sahip hücreler oluşur. Ancak önemli bir nokta, baskın şekilde mutant mitokondri taşıyan bir çok bireyde hastalığın gelişmemesidir. Bu durum, henüz tanımlanmamış ilave genetik veya çevresel faktörlerin LHON gelişiminde önemli rol oynadıkları izlenimini vermektedir.

Önleme ve Tedavi

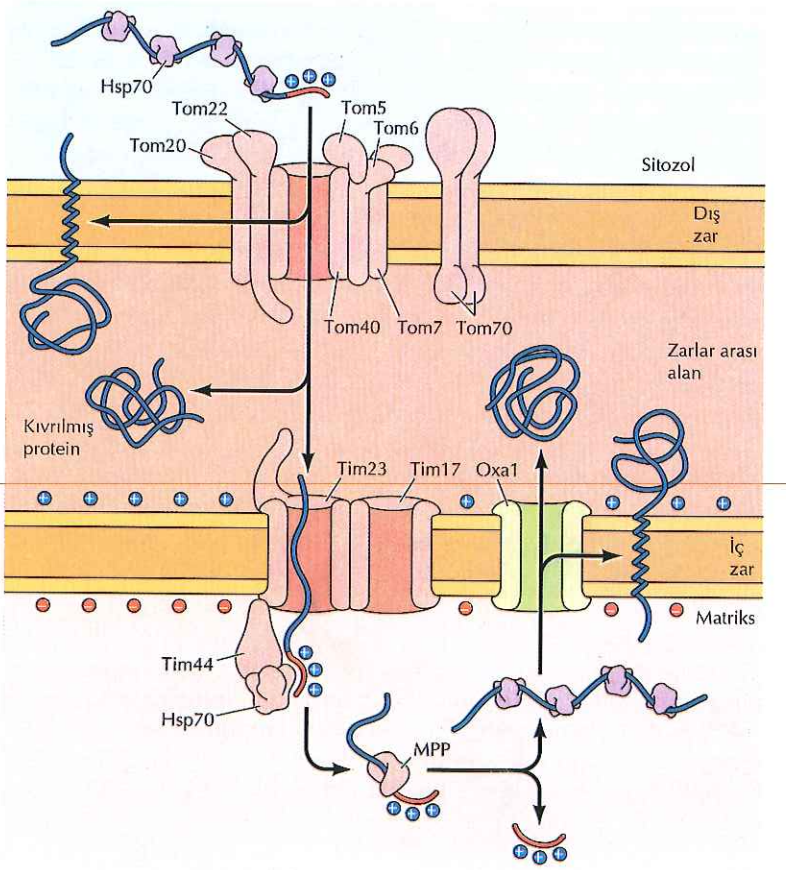
LHON'dan sorumlu mitokondri DNA'sı mutasyonlarının tanımlanması hastalığın moleküler tanısına olanak vermektedir ki bu da, aile hikayesi olmayan hastaların kesin tanısının oluşturulmasında çok önemli olabilir. Buna karşın, mitokondri DNA'sında mutasyonların saptanması, etkilenen ailelerin taranması veya aile planlaması açısından bir değer taşımaz. Bu durum, moleküler analizlerle bir aile bireyinin veya embriyonun mutant mı, doğal-tip allel mi taşıdığının belirlenebildiği, kalıtılan nüklear gen mutasyonlarının belirlenmesindeki yararıyla çelişir. Bununla birlikte, LHON'da büyük miktarda mutant mitokondri bulunur ve anneden tüm çocuklara iletilir. Yukarıda belirtildiği gibi, çocuklardan hepsi hastalığı geliştirmez, fakat bu, genetik analizlerle önceden anlaşılamaz.

LHON'a mitokondri DNA'sı mutasyonlarının neden olduğunun anlaşılması, yeni tedavi potansiyeli öngörür. Yaklaşımlardan biri, elektron taşıma yolağına, süksinat ya da koenzim Q gibi sübstrat ve kofaktörlerin verilmesiyle oksidatif fosforilasyonu güçlendirmeye yönelik metabolik tedavidir. LHON için düşünülen diğer bir tedavi olasılığı, genin normal bir allelini nükleusa yerleştirmek üzere tasarlanan gen tedavisidir. Gen ürününe, mitokondri tarafından kodlanan bozuk proteinin yerini almak üzere mitokondriye yönlendirecek uygun bir hedefleme sinyali eklenmelidir.

Kaynaklar

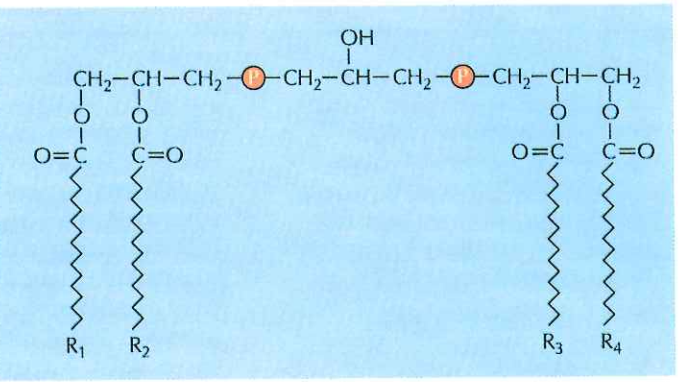
Brown, M. D., D. S. Voljavec, M. T. Lott, I. MacDonald and D. C. Wallace. 1992. Leber's hereditary optic neuropathy: A model tor mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J.* 6:2791-2799.

Riordan-Eva, P. and A. E. Harding. 1995. Leber's hereditary optic neuropathy: The clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J. Med. Genet.* 32: 81-87.



Şekil 10.6 Öncül diziye sahip proteinlerin farklı mitokondri bölmelerine ayrımlanması
N-ucu öncül dizisi içeren proteinler dış zara, iç zara ya da zarlar arası alana alınabilir. Bu proteinlerin öncül dizileri Tom20 ve Tom22 reseptörlerince tanınır ve Tom40'a aktarılır. Dış zara hedeflenen proteinler Tom40 kompleksinde taşınımı durdurarak yandan zar içerisine geçer. Zarlar arası alanda yerleşecek olan bazı proteinler Tom40 dan geçirilirler, ancak Tim23 kompleksiyle etkileşmek yerine zarlar arası alanda kalırlar. Diğer proteinler Tim23 içerisinden mitokondri matriksine aktarılırlar. Matriksde öncül dizinin uzaklaştırılması, proteinleri gerisingeri iç zara ya da Oxa1 aktarım kanalı aracılığıyla zarlar arası alana yönlendiren ikinci bir ayrımlanma sinyalini açığa çıkartır.

Şekil 10.7 Kardiyolipinin yapısı
Kardiyolipin, dört yağ asitli, öncelikle mitokondri iç zarında bulunan ender bir "çift" fosfolipiddir.



ancak Tim23'e girmeyerek zarlar arası alanda kalırlar. Zarlar arası alanda kalacak olan diğer bazı proteinler, bazı iç zar proteinlerinde olduğu gibi, önce iç zardan geçirilerek mitokondri matriksine alınırlar. Bunlar daha sonra, öncül dizinin matriksde kesilmesiyle belirginleşen ikinci bir dağıtım sinyali tarafından yeniden taşınmaya hedeflenirler. Bu ikinci dağıtım sinyali onları üçüncü bir translokaz olan Oxa1'e yönlendirir ki burada, ya zarlar arası alana geçirilirler ya da geçiş sırasında aktarımı-durdur sinyali ile durdurulur ve iç zarın içerisine yerleştirilirler. Oxa1 aynı zamanda mitokondri genomu tarafından kodlanan ve matriksde mitokondri ribozomlarında sentezlenen, zarlar arası ve zar içi proteinler için de translokazdır.

Sadece proteinler değil mitokondri zarlarındaki fosfolipidler de sitoplazmadan alınır. Hayvan hücrelerinde, fosfatidilkolin ve fosfotidiletanolamin ER de sentezlenirler ve ER zarından tek fosfolipid moleküllerini alan **fosfolipid transfer proteinleri** tarafından mitokondriye taşınırlar. Lipidler, sitoplazmanın su ortamında bu proteinin hidrofobik bağlanma bölgesine gömülmüş olarak taşınır ve kompleks, mitokondrininki gibi başka bir zara ulaştığında serbest bırakılır. Daha sonra mitokondriler dört yağ asidi zinciri içeren nadir bir fosfolipid olan **kardiolipin**'in sentezini katalizlemenin yanı sıra, fosfatidiletanolamin'den fosfotidilserin sentezler (Şekil 10.7).

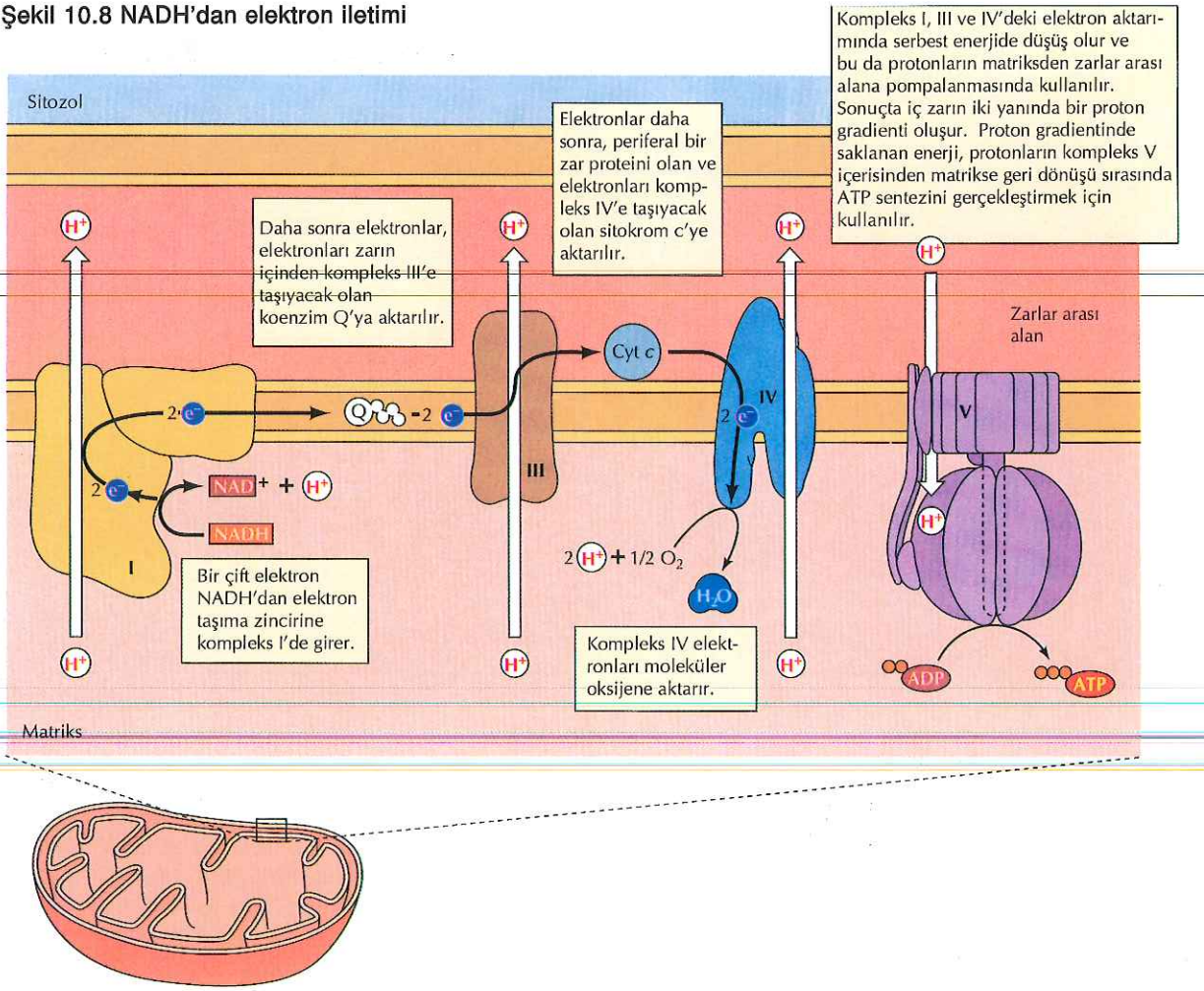
Oksidatif Fosforilasyon Mekanizması

Karbohidratların veya yağların yıkılmasından elde edilen kullanılabilir enerjinin büyük kısmı mitokondri içerisinde yer alan oksidatif fosforilasyonla sağlanır. Örneğin, glukozun glikoliz ve sitrik asit döngüsü reaksiyonlarıyla yıkımından toplam olarak dört molekül ATP, on molekül NADH ve iki molekül $FADH_2$ kazanılır (Bkz. Bölüm 2). Daha sonra NADH ve $FADH_2$ deki elektronlar moleküler oksijene aktarılırken oksidatif fosforilasyonla 32 ila 34 ATP molekülü daha oluşturulur. Hücresel enerjinin en büyük bölümünün kaynağını oluşturan elektron taşıma ve oksidatif fosforilasyon, mitokondri iç zarındaki protein komplekslerin önemli aktiviteleridir.

Elektron Taşıma Zinciri

Oksidatif fosforilasyon sırasında NADH ve $FADH_2$ den çıkan elektronlar O_2 ile birleşir ve bu yükseltgenme/indirgenme reaksiyonları sırasında açığa çıkan enerji ADP den ATP sentezlemek için kullanılır. Elektronların NADH'dan O_2'ye taşınması, taşınan her bir çift elektron için $\Delta G^{\circ\prime}$ = - 52.5 kcal/mol ile, çok enerji- üreten bir reaksiyondur. Kullanıma uygun şekilde toplanabilmesi için enerjinin,

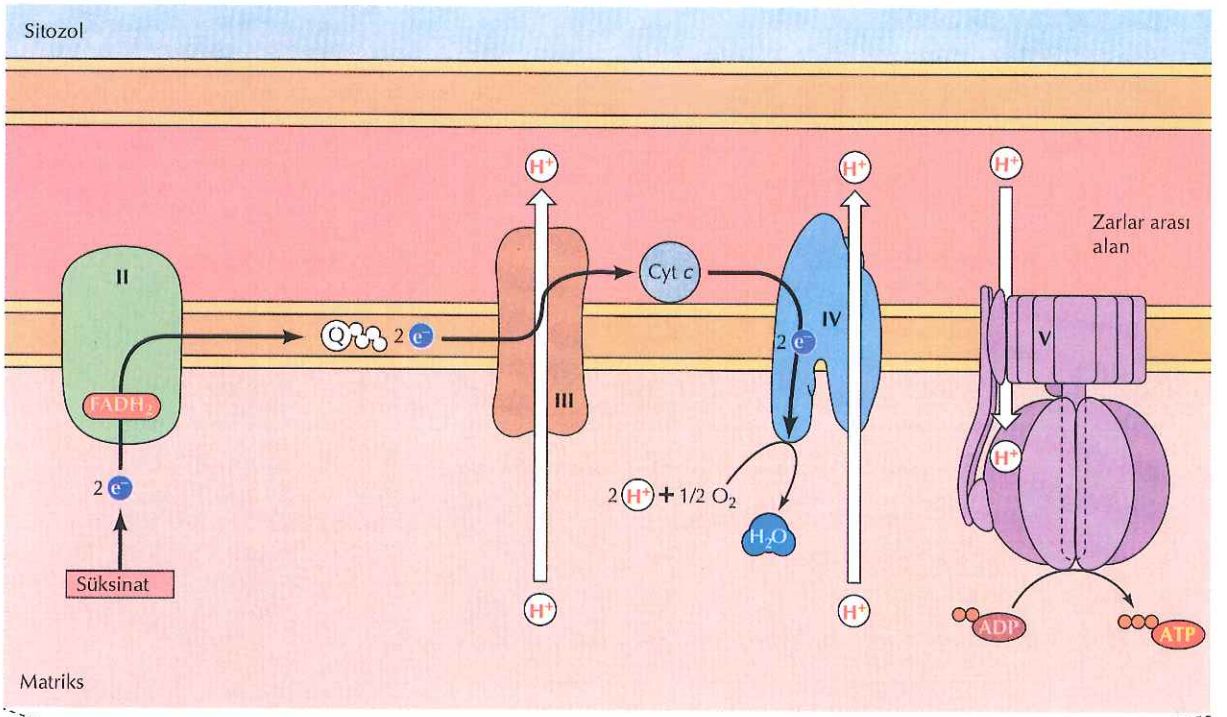
Şekil 10.8 NADH'dan elektron iletimi



elektronları **elektron taşıma zincirini** oluşturan bir dizi taşıyıcıdan geçirerek, yavaş, yavaş çıkartılması gerekir. Bu taşıyıcılar mitokondri iç zarında dört kompleks halinde düzenlenmiştir. Beşinci bir protein kompleks, enerji-sağlayan elektron taşıma reaksiyonunun ATP senteziyle birleşmesini sağlar.

NADH ile gelen elektronlar, elektron taşıma zincirine, yaklaşık 40 polipeptidden oluşan kompleks I'den girer (Şekil 10.8). Bu elektronlar önce NADH'dan flavin mononükleotide, daha sonra demir-kükürt kompleksi üzerinden koenzim Q'ya aktarılır -enerji- üreten $\Delta G°'$=-16.6 kcal/mol değerinde bir süreç. **Koenzim Q** (**ubikinon** da denir) küçük, lipidde-çözünen bir moleküldür, elektronları kompleks I'den, yaklaşık on polipeptidden oluşan kompleks III'e, zar içinden aktarır. Kompleks III'de elektronlar sitokrom b'den sitokrom c'ye $\Delta G°'$ = -10.1 kcal/mol lük, enerji üreten bir reaksiyonla geçirilir. İç zarın dış yüzüne bağlı bir periferal zar proteini olan **Sitokrom c**, elektronları son olarak O_2'e aktaracak olan kompleks IV'e (sitokrom oksidaz) taşır ($\Delta G°'$ = -25.8 kcal/mol).

Dört polipeptidden oluşan farklı bir protein kompleks (kompleks II), elektronları bir sitrik asit döngüsü ara ürünü olan süksinattan alır (Şekil 10.9). Bu elektronlar NADH'ya değil $FADH_2$'ye ve daha sonra koenzim Q'ya aktarılır. Daha önce anlatıldığı gibi, elektronlar koenzim



Şekil 10.9 $FADH_2$'den elektron taşınması
Süksinattan gelen elektronlar elektron taşıma zincirine $FADH_2$ aracılığıyla kompleks II'den girer. Daha sonra koenzim Q'ya aktarılırlar ve Şekil 10.8'de anlatıldığı şekilde, elektron taşıma zincirinde taşınırlar. Elektronların $FADH_2$'den koenzim Q'ya aktarımı önemli bir serbest enerji düşmesine neden olmadığından, kompleks II'de zardan proton pompalanmaz.

Q'dan kompleks III'e ve daha sonra kompleks IV'e aktarılırlar. Kompleks I'de elektronların NADH'dan koenzim Q'ya aktarılmasının aksine, elektronların $FADH_2$'den koenzim Q'ya aktarımı serbest enerjide önemli bir düşüş sağlamaz, bu nedenle de ATP sentezi oluşturamaz. Sonuç olarak, $FADH_2$'den çıkan elektronların elektron taşıma zincirinden geçişi sırasında sadece kompleks III ve IV'de serbest enerji elde edilir.

Elektronların kompleks I, III ve IV'den geçirilmesinden elde edilen serbest enerji, ATP sentezi ile eşlenerek depolanır. Elektron taşınma reaksiyonlarından çıkan enerjinin ATP senteziyle eşlenme mekanizması, glikoliz ya da sitrik asit döngüsü sırasındaki ATP sentezinden temel olarak farklıdır. İkinci durumda, yüksek enerjili bir fosfat ADP'ye diğer bir substrattan, enerji-üreten bir reaksiyonla aktarılır. Örneğin glikolizin son tepkimesinde fosfoenolpiruvat'ın yüksek enerjili fosfatı ADP'ye aktarılarak piruvat ve ATP elde edilir (bkz. Şekil 2.32). Bu şekilde yüksek enerjili fosfat gruplarının direkt aktarımı elektron taşınması sürecinde görülmez. Bunun yerine, elektronun taşınması sırasında çıkan enerji iç mitokondri zarının iki yanında proton gradienti oluşumuyla eşlenir. Bu gradientte saklanan potansiyel enerji daha sonra, zardan, enerjetik olarak desteklenen proton geri akışıyla ATP sentezini eşleyen beşinci protein kompleksi tarafından toplanır.

Kemiozmotik Eşlenme

Elektron taşınımını ATP üretimiyle eşleyen mekanizma, **kemiozmotik eşlenme**, hücre biyolojisinde yapı ile işlev ilişkisinin çarpıcı bir

örneğidir. Kemi ozmotik eşlenme hipotezi, ATP nin, yüksek enerji gruplarının direkt aktarımıyla değil biyolojik zarlarda proton gradienti yapısında tutulan potansiyel enerjinin kullanılmasıyla oluşturulduğunu öne süren Peter Mitchell tarafından 1961'de ilk kez ortaya atılmıştır. Biyokimyacılar başlangıçta bu hipoteze şüpheyle yaklaştılar ve kemiozmotik hipotezin bilim camiasında kabul görmesi on yıldan fazla sürdü. Destekleyen ağırlıklı kanıtların nihayet birikmesiyle bu gün kemiozmotik eşlenme, sadece mitokondride değil kloroplastlarda ve ATP nin hücre zarındaki proton gradienti ile oluşturulduğu bakterilerde de işleyen, ATP üretiminde genel bir mekanizma olarak benimsenmiştir.

Kompleks I, III ve IV üzerinden elektron taşınması protonların mitokondrinin iç bölümünden dışarı taşınmasına eşlenir (Bkz. Şekil 10.8). Böylece elektron taşınımının enerji-üreten tepkimeleri, iç zarın iki yanında proton gradienti oluşturmak üzere protonların matriksden zarlar arası alana aktarılmasına eşlenir. Kompleks I ve IV, elektron taşınımıyla uyarılan bir yapısal değişiklik sonucu protonları zarın öte yanına aktaran proton pompaları şeklinde davranırlar. Kompleks III'de protonlar zarın diğer yanına, protonları kompleks I ya da II'de matriksden alarak kompleks III'de zarlar arasına bırakan koenzim Q tarafından aktarılır. Kompleks I ve III her ikisi de, her elektron çifti başına dört protonu zardan aktarırlar. Kompleks IV'de her elektron çifti başına zardan iki proton pompalanır ve her elektron çifti için diğer iki proton, matriksde H_2O oluşturmak üzere O_2 ile birleşir. Böylece, bu üç kompleksin her birinde, bir elektron çifti için dört proton eşdeğeri mitokondri matriksinden dışarı taşınır. Protonların matriksden zarlar arası alana aktarımı, elektron taşınması sürecindeki yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarından elde edilen enerjinin proton gradientinde saklı potansiyel enerjiye çevrilmesinde önemli rol oynar.

Protonlar elektrik yüklü partiküller olduklarından, proton gradientinde saklı potansiyel enerjinin biçimi kimyasal olduğu kadar elektrikseldir. Elektrik bileşeni, iç mitokondri zarının iki yanında, mitokondri matriksi negatif zarlar arası alan pozitif olacak şekilde, bir voltaj farklılığına neden olur. Bunun serbest enerji değeri

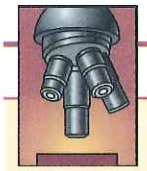
$$\Delta G = -F\Delta V$$

eşitliği ile belirlenir, burada F Faraday sabiti ve ΔV zar potansiyelidir. Zarın iki yanındaki proton konsantrasyonlarının farklılığından kaynaklanan ek serbest enerji

$$\Delta G = RT\,\ell n\frac{[H^+]_i}{[H^+]_0}$$

eşitliği ile belirtilir, burada $[H^+]_i$ ve $[H^+]_o$ sırasıyla mitokondrinin içindeki ve dışındaki proton konsantrasyonlarını verir.

Metabolik olarak aktif hücrelerde, iç zarın iki yanındaki proton gradienti bir pH birimine denk ya da mitokondri içerisinde on kat daha düşük konsantrasyonda proton olacak şekilde matriksden dışarı proton pompalanır (Şekil 10.10). Sitozolün ve zarlar arası bölgenin nötral pH'sına (yaklaşık olarak 7) kıyasla mitokondri matriksinin pH'ı 8



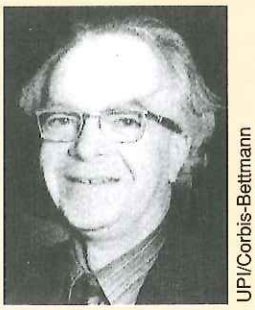
ANAHTAR DENEYLER

Kemiozmotik Teori

Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic Type of Mechanism

Peter Mitchell
University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland

Nature, 1961, Volume 191, pages 144-148



UPI/Corbis-Bettmann

Peter Mitchell

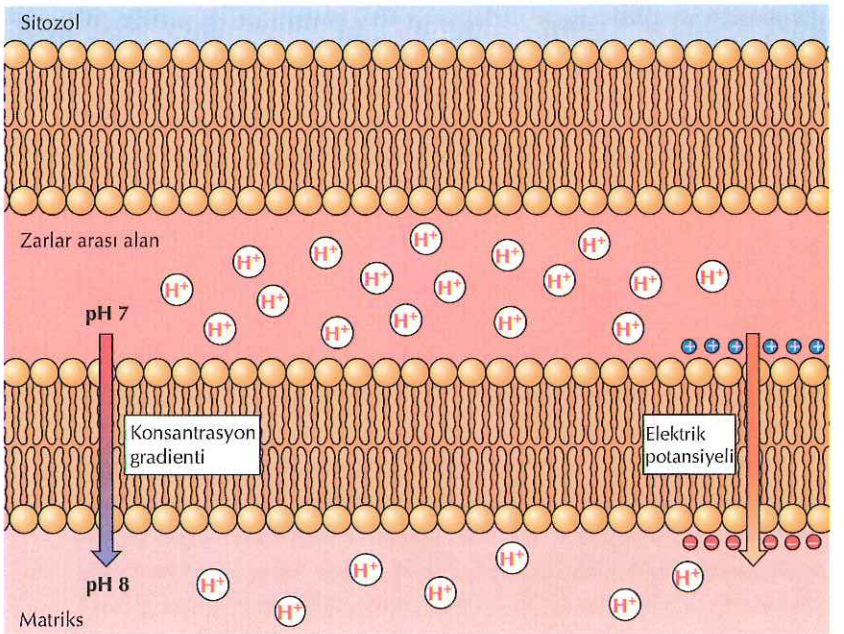
Bağlam

Oksidatif fosforilasyonun, elektronların bir dizi taşıyıcıdan geçirilerek moleküler oksijene aşamalı aktarımını kapsadığı 1950'lerde açıkça gösterilmişti. Ancak, bu elektron aktarım reaksiyonlarından çıkan enerjinin ATP'ye nasıl çevrildiği gizemini korumaktaydı. Doğal kanı, glikoliz sürecinde gerçekleştiği bilinen tarzda, yüksek- enerjili fosfat gruplarının diğer bir ara üründen direkt aktarımıyla ADP'nin ATP'ye çevrildiği şeklindeydi. Böylece, elektron taşınma reaksiyonlarının sonucunda yüksek-enerjili ara ürünlerin oluştuğuna ve daha sonra bu ara ürünlerin fosfat grubu transferiyle ATP sentezini sağladıklarına inanıldı.

Varlığına inanılan bu yüksek-enerjili ara ürünlerin araştırılması 1950'lerde ve 1960'larda araştırmaların başlıca amacı haline geldi. Ancak, bir çok sahte kanıta karşın, herhangi bir ara ürün bulunmayacaktı. Ayrıca oksidatif fosforilasyonun bazı özelliklerinin, ATP'nin basit bir fosfat grubu transferiyle sentezlendiği şeklindeki geleneksel hipotezle açıklanabilmesi zordu. Öncelikle, fosforilasyon zarlarla yakından ilişkiliydi ve zar yapısını bozan çeşitli bileşikler tarafından inhibe ediliyordu. Bu görüşler Peter Mitchel'i enerji eşlenmesi için, ATP sentezinin diğer araştırmacıların bulmaya çalıştıkları esrarengiz yüksek-enerjili bir ara ürün ile değil bir zarın iki yanında oluşan elektrokimyasal gradientle sağlandığı şeklinde, temelde oldukça farklı bir mekanizma önermeye itti.

Deneyler

Kemiosmotik hipotezin temelde ileri sürdüğü, elektron taşınmasını ATP sentezine eşleyen "ara ürün"ün zarın iki yanındaki proton elektrokimyasal gradienti olduğu idi. Mitchel, böyle bir gradientin elektron taşınmasıyla



Şekil 10.10 Proton gradientinin elektrokimyasal doğası
Protonların pozitif yüklü olmaları nedeniyle, iç mitokondri zarının iki yanında oluşan proton gradientinin hem kimyasal hem de elektrik bileşkesi vardır. Kimyasal bileşke proton konsantrasyonu, veya pH, gradientidir ki, iç mitokondri zarının sitozolik yanında on kat daha yüksek proton konsantrasyonundan (bir pH birimlik fark) kaynaklanır. Ayrıca zarın iki yanında, sitozol tarafındaki net pozitif yük artışından kaynaklanan bir elektrik potansiyeli vardır.

oluştuğunu, protonların enerjetik olarak uygun olan yönde zardan geri geçişinin ATP senteziyle eşlendiğini varsaydı (şekle bakınız).

Kemiosmotik eşlenme hipotezi, ATP sentezi için bozulmamış zar yapısının gerekliliği yanı sıra, yüksek- enerjili bir ara ürün bulunamamış olmasına da açıklık getirdi. Ancak, zamanın biyokimya inanışlarıyla ters düşen radikal bir düşünceydi. 1961 tarihli bu makalenin son paragrafında Mitchell devrimci görüşü için felsefi bir yorum eklemişti:

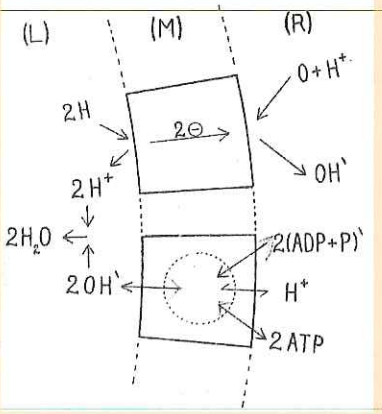
> *Gerçek bilimde neden ve sonuç ardışık olaylardan başka bir şey değildir. Biyokimyacılar, şu anda genel olarak metabolizmanın zardan geçişe neden olduğu fikrini benimsiyorlar. Burada öne sürülen hipotezin altında yatan sav, eğer metabolizma ve taşıma olarak adlandırdığımız süreçler ardışık olayları simgeliyorlarsa, yalnızca metabolizmanın taşımanın nedeni değil, taşımanın da metabolizmanın nedeni olabileceğidir.*

Etki

Mitchell'in hipotezi on yıldan daha uzun bir süre kuşkuyla karşılandı ve sert tartışmalara konu oldu. Buna rağmen, diğer araştırmacıların ve Mitchell ile ekibinin elde ettikleri destekleyici kanıtların çokluğu sonuçta kemiozmotik hipotezin- aslında kemiozmotik teori olarak tanındı- genel kabul görmesini sağladı. Artık sadece; bakteri, mitokondri ve kloroplastta oksidatif fosforilasyon ve fotosentez sürecinde ATP üretiminin esası olarak değil, aynı zamanda hücre zarlarından çeşitli moleküllerin enerji- gerektiren taşınımı için de temel olarak kabul edildi.

Mitchell'in çalışması 1978'de Nobel ödülüyle ödüllendirildi. Bu vesileyle yapmış olduğu konuşma şöyle başladı:

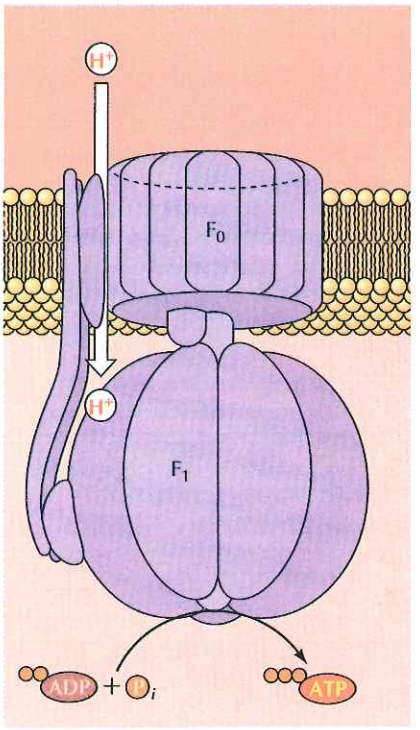
> *Her ne kadar, vektöryel metabolizmanın ve biyolojik enerji transferinin kemiozmotik mantığının bir gün genel kabul göreceğini ummuşsam da, gerçekleşmesini beklemek haddimi aşmak olacaktı. Yeni bir bilimsel görüş karşıtlarının ikna olmasıyla değil, aslında karşıtlarının nihayet ölmesi sonucu zafer kazanır diyen Max Planck değil miydi? Gerçek şu ki, kemiozmotik hipotez olarak başlayan şimdi kemiozmotik teori olarak alkışlanıyor....bu beni hem şaşırttı hem mutlu etti, bunun en önemli nedeni, önceleri benim en yetenekli karşıtlarım olan kişilerin halen bilimsel yaşamlarının en başarılı noktasında olmaları.*



Mitchel'in, sulu R fazı içindeki sulu L fazını çevreleyen bir zar (M) içerisinde, elektron taşıma sistemi (yukarıda) ile ATP-üreten bir sistem (aşağıda) arasındaki kemiozmotik eşlenmeyi anlatımı.

civarındadır. Bu gradient, matriks negatif olmak üzere zarın iki yanında 0.14 V'luk bir elektrik potansiyeli oluşturur. Hem pH gradienti hem elektrik potansiyeli protonların sitozolden matrikse geri dönmesini sağlarlar ve bir araya gelerek iç zarın iki yanında ΔG'si her proton için yaklaşık -5 kcal/mol olan bir **elektrokimyasal gradient** oluştururlar.

Fosfolipid çift tabaka iyonları geçirmediği için, protonlar zardan sadece protein bir kanal içinden geçebilirler. Bu kısıtlama elektrokimyasal gradientteki enerjinin kullanılabilmesine ve oksidatif fosforilasyona dahil olan beşinci kompleksin, kompleks V ya da **ATP sentaz**, faaliyeti sonucu ATP'ye dönüştürülmesine olanak sağlar (bkz. Şekil 10.8). ATP sentaz, yapıları farklı ve ince bir sapla birleşen iki ayrı bileşenden, F_0 ve F_1,oluşur (Şekil 10.11). F_0 bölümü iç zarı kat eder ve protonların zarlar arası alandan matrikse geri dönmesine olanak veren bir kanal oluşturur. Protonların matrikse enerjetik olarak desteklenen dönüşü ATP sentezine, ADP ile fosfat iyonlarından (P_i) ATP sentezini katalizleyen F_1 alt birimi ile eşlenir. Detaylı yapısal çalışmalar, F_0 ile F_1 alt birimleri arasında mekanik bir birlikteliği gerektiren ATP sentaz çalışma prensibini tanımlamıştır. Kısaca, Protonların F_0 içinden akışı F_1'in bir bölümünün dönmesini sağlar, bu da ATP sentezleyen bir döner motor gibi etkiler.



Şekil 10.11 ATP sentaz'ın yapısı
Mitokondri ATP sentazı (kompleks V), ince bir sapla birbirine bağlanmış iki adet çok alt birimli bileşen, F0 ve F1, içerir. F0, içerisinden protonların zarı geçebileceği bir kanal oluşturacak şekilde lipid çift tabakasını kat eder. F1, elektrokimyasal gradienti düşürecek yöndeki proton hareketinden serbest enerjiyi, ATP sentezini katalizleyerek tutar.

Her biri, bir ATP sentezini desteklemek üzere proton gradientine yeterli serbest enerjiyle katkıda bulunan kompleks I, III ve IV'deki proton aktarımı ile tutarlı biçimde, F_1 tarafından bir molekül ATP sentezlenebilmesi için zarı F_0 içerisinden geçerek, dört protonun geri dönmesi gerekir. Böylece, bir molekül NADH'ın oksitlenmesi üç molekül ATP sentezi sağlarken, elektron taşıma zincirine kompleks II'den giren $FADH_2$'nin oksidasyonu sadece iki ATP sağlar.

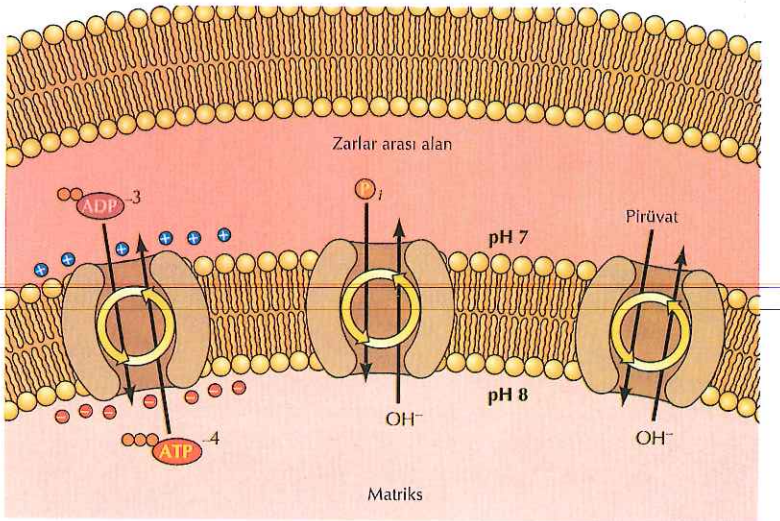
Metabolitlerin İç Zardan Taşınması

Elektrokimyasal gradientte saklı potansiyel enerji, ATP sentezini desteklemesinin yanı sıra küçük moleküllerin mitokondrinin içine ve dışına taşınımını da destekler. Örneğin; mitokondride sentezlenen ATP'nin sitozole gönderilmesi gerektiği gibi, ATP sentezinin devamlılığı için sitozolden ADP ve Pi nin alınması da gerekir. Proton pompalanmasıyla oluşturulan elektrokimyasal gradient mitokondri içerisinde yoğunlaştırılması gereken bu gibi moleküllerin ve diğer metabolitlerin taşınması için gerekli enerjiyi sağlar (Şekil 10.12).

ATP ve ADP'nin iç zardan taşınması, zara yerleşik ve adenin nükleotid yer-değiştirici denilen bir protein tarafından, mitokondriden sitozole gönderilen her bir ATP molekülüne karşılık bir ADP molekülünü mitokondri içerisine aktararak gerçekleştirilir. ATP'nin ADP'den daha fazla negatif yük taşıması nedeniyle (-3 e karşı -4), bu alışveriş elektrokimyasal gradientin voltaj bileşeni tarafından gerçekleştirilir. Proton gradienti zarın sitozolik tarafında pozitif yük oluşturduğu için, ATP'nin ADP ile yer değiştirerek içeri alınması enerjetik olarak uygundur.

Mitokondride ATP sentezi ADP kadar fosfat iyonu (P_i) da gerektirdiği için, P_i'ın da sitozolden içeri alınması gerekir. Bu, fosfatı ($H_2PO_4^-$) içeri alıp hidroksil iyonunu (OH^-) dışarı gönderen bir diğer zar proteini aracılığıyla gerçekleşir. Fosfat ve hidroksil iyonlarının her ikisi de -1 yüke sahip olduklarından bu karşılıklı değişim elektriksel olarak nötrdür. Bununla birlikte karşılıklı değişim proton konsantrasyon gradientiyle sağlanır, mitokondri içerisindeki yüksek pH daha fazla hidroksil iyonu demektir ve zarın sitozolik tarafına geçişi daha uygundur.

Elektrokimyasal gradientteki enerji benzer şekilde diğer metabolitlerin de mitokondriye taşınmasını sağlar. Örneğin; pirüvatın sitozolden içeri alınması (glikoliz sırasında üretilir), pirüvatı hidroksil iyonlarıyla değiştiren bir taşıma proteini aracılığıyla gerçekleşir. Sitrik asit döngüsünün diğer ara ürünleri de mitokondri ile sitozol arasında benzer değişim mekanizmalarıyla gidip gelebilirler.



Şekil 10.12 Metabolitlerin mitokondri iç zarından taşınımı
Küçük moleküllerin iç zardan taşınımı zarı- kat eden proteinler aracılığıyla ve elektrokimyasal gradient sayesinde gerçekleşir. Örneğin, ATP mitokondriden sitozole, onu ADP ile değiştiren bir taşıyıcı tarafından gönderilir. Elektrokimyasal gradientin voltaj bileşeni bu karşılıklı değişimi sağlar: ATP (-4) ADP'den (-3) daha fazla negatif yük taşır, bu nedenle ADP mitokondri içine alınırken ATP mitokondri matriksinden sitozole gönderilir. Buna karşılık, fosfatın (P_i) ve pirüvatın taşınmaları hidroksil iyonları (OH^-) ile değiştirilerek gerçekleşir; bu durumda, elektrokimyasal gradientin pH bileşeni P_i ve pirüvatın mitokondriye taşınmasına eşlenen hidroksil iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlar.

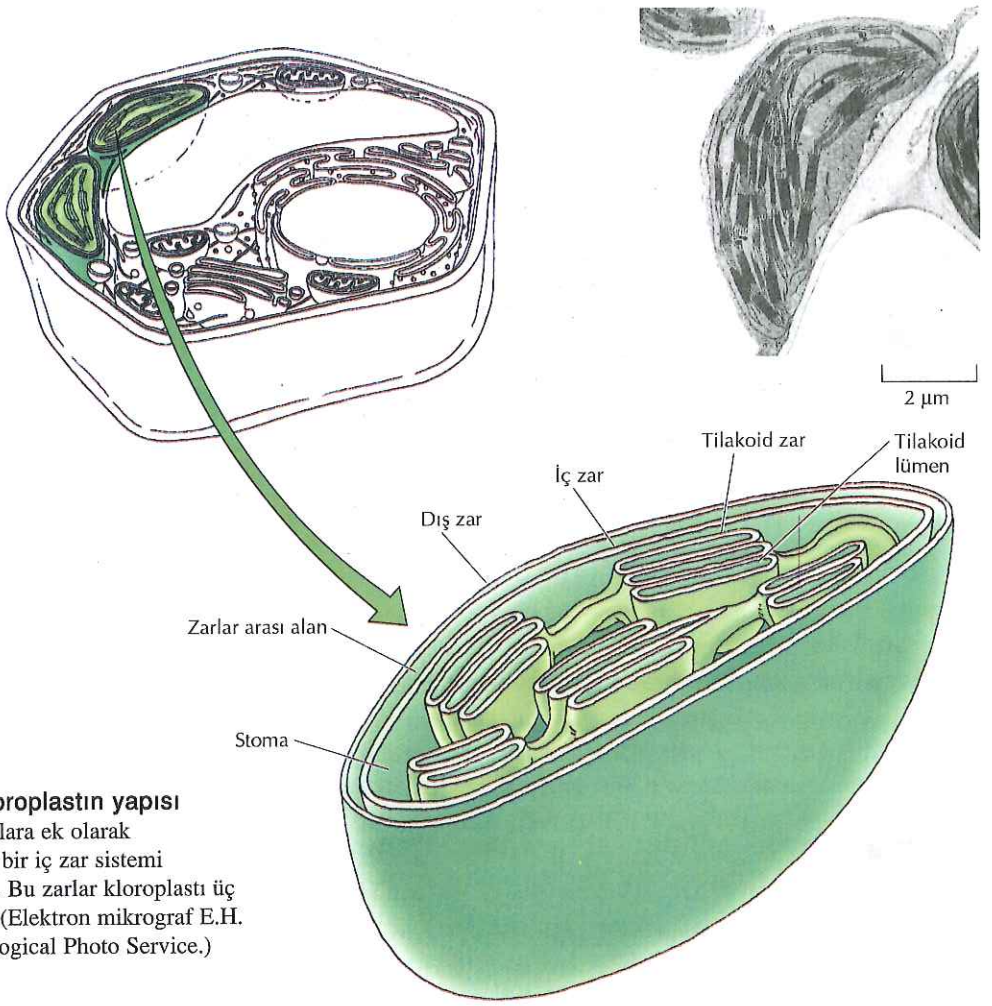
Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

Fotosentezden sorumlu organeller olan **kloroplastlar**, bir çok yönleriyle mitokondrilere benzerler. Kloroplastlar ve mitokondriler her ikisi de, metabolik enerji üretirler, evrim sürecinde endosimbiyoz sonucu oluşmuşlardır, kendi genetik sistemlerine sahiptirler ve bölünerek çoğalırlar. Ancak, kloroplastlar mitokondrilerden daha büyük ve daha karmaşıktır ve ATP üretimine ek olarak bazı önemli görevleri yerine getirirler. En önemlisi, kloroplastların, CO_2'in fotosentez yoluyla karbohidratlara dönüştürülmesinden sorumlu olmalarıdır. Kloroplastlar ayrıca, amino asitleri, yağ asitlerini ve kendi zarlarının lipid bileşenlerini de sentezlerler. Azotun organik bileşiklerin yapısına girmesi için ana yol olan, nitritin (NO_2^-) amonyağa (NH_3) indirgenmesi de kloroplastlarda gerçekleşir. Üstelik kloroplastlar, bitki hücrelerinde çeşitli görevler üstlenmiş birkaç tip ilişkili organelden (plastidler) sadece biridir.

Kloroplast Yapı ve İşlevi

Bitki kloroplastları, mitokondriler gibi, kloroplast zarfı adı verilen çift zarla kaplanmış, büyük (5 ila 10 µm uzunluk) organellerdir (Şekil 10.13). Kloroplastlar, zarfın iç ve dış zarlarına ek olarak tilakoid zar adı verilen üçüncü bir iç zara sahiptirler. **Tilakoid zar**, tilakoid adı verilen yassı diskler oluşturur ki bunlar da grana denilen yığınlar şeklinde düzenlenirler. Bu üç zar yapısı nedeniyle kloroplastların iç düzeni mitokondrininkinden daha karmaşıktır. Özellikle, üç zar kloroplastı üç farklı bölmeye ayırır; (1) kloroplast zarfının iki zarı arasındaki zarlar arası alan, (2) zarfın içinde ancak tilakoid zarın dışında kalan **stroma** ve (3) tilakoid lümen.

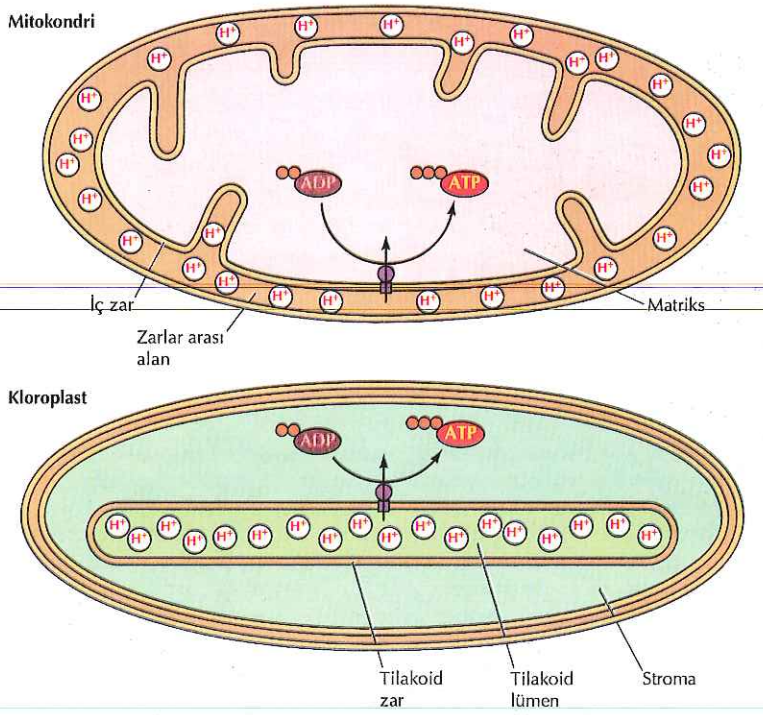
Daha karmaşık olmasına karşın kloroplast zarları, beklendiği gibi, mitokondrininkilerle, ATP'nin kemiozmotik üretiminde her iki organelin rolünü belirleyen açık bir işlevsel benzerliğe sahiptir. Kloroplast zarfının dış zarı, mitokondrininki gibi, porinler içerdiği için küçük moleküllerin serbest geçişine izin verir. Buna karşılık, iç zar iyonları ve metabolitleri geçirmez, bu nedenle kloroplasta ancak



Şekil 10.13 Bir kloroplastın yapısı
Zarftaki iç ve dış zarlara ek olarak kloroplastlar üçüncü bir iç zar sistemi içerirler: tilakoid zar. Bu zarlar kloroplastı üç iç bölmeye ayırırlar. (Elektron mikrograf E.H. Newcombe'dan/Biological Photo Service.)

zardaki özgün taşıyıcılar aracılığıyla girebilirler. Kloroplast zarfının iç ve dış zarlarının bu özellikleri mitokondrinin iç ve dış zarlarına benzer: Her iki durumda da iç zar organelin içi ile sitozol arasında moleküllerin geçişini engeller. Kloroplast stroması da işlevsel açıdan mitokondri matriksine eşdeğerdir: Kloroplast genetik sistemini ve çeşitli metabolik enzimleri içerir, ki bunlara, fotosentez sırasında CO_2'in karbohidratlara dönüştürülmesinden sorumlu olanlar da dahildir.

Yapı ve işlev bakımından kloroplastlar ile mitokondriler arasındaki en büyük fark tilakoid zardır. Kloroplastın bu zarı temel öneme sahiptir, elektron taşınmasında ve ATP'nin kemiozmotik üretiminde mitokondri iç zarının görevini üstlenir (Şekil 10.14). Kloroplast zarfının iç zarı (katlanarak krista oluşturmaz) fotosentezde görev almaz. Bunun yerine, kloroplast elektron taşıma sistemi tilakoid zarda yerleşiktir ve protonlar bu zarın bir yanından diğer yanına, stromadan tilakoid lümenin içine pompalanırlar. Oluşan elektrokimyasal gradient, protonların stromaya geri dönüşü sırasında ATP sentezini gerçekleştirir. Metabolik enerji oluşumundaki rolü açısından kloroplast tilakoid zarı mitokondri iç zarına denktir.



Şekil 10.14 Kloroplast ve mitokondrilerde kemiozmotik ATP üretimi
Mitokondrilerde elektron taşınımı iç zarın iki yanında bir proton gradienti oluşturur ki bu da, matriksde ATP sentezinin yürütülmesi için kullanılır. Kloroplastlarda proton gradienti tilakoid zarın iki yanında oluşur ve stromada ATP sentezinin yürütülmesi için kullanılır.

Kloroplast Genomu

Mitokondriler gibi kloroplastlar da, evrimde fotosentetik bakterilerden köken aldıklarının göstergesi olarak kendi genetik sistemlerine sahiptirler. Kloroplast genomları, her organelde çok sayıda kopya halinde bulunan çembersel DNA'lardan oluşmalarıyla mitokondri genomlarına benzerlik gösterirler. Ancak, kloroplast genomu mitokondri genomundan daha büyük ve daha karmaşıktır, 120 ila 160 kb arasındadır ve yaklaşık 150 gen içerir.

Birkaç bitkinin kloroplast genomlarının dizini tümüyle belirlenmiş ve organel DNA'larının içerdiği genlerin çoğu tanımlanmıştır. Bu kloroplast genleri gen ekspresyonunda görevli RNA ve proteinleri kodladıkları gibi, fotosentezde işlev gören çeşitli proteinleri de kodlar (Tablo 10.2). Kloroplast mRNA'larının çevriminde kullanılan ribozomal ve taşıyıcı RNA'lar organel genomu tarafından kodlanır. Bunlar, dört rRNA (23S, 16S, 5S ve 4.5S) 30 tRNA türünü kapsar. Mitokondri genomunun kodladığı daha az sayıdaki tRNA'ya karşın, kloroplast tRNA'ları tüm mRNA kodonlarını evrensel genetik koda göre okumak için yeterlidir. Çeviri sistemindeki RNA bileşenlerinin yanı sıra, kloroplast genomu yaklaşık 20 ribozomal protein kodlar ki bunlar kloroplast ribozom proteinlerinin yaklaşık olarak üçte birini oluşturur. RNA polimerazın bazı alt birimleri kloroplastda kodlanıyor ise de, RNA polimerazın diğer alt birimleri ve kloroplast gen ekspresyonu için gerekli diğer faktörler nükleusda kodlanır.

TABLO 10.2 Kloroplast DNA'sında Kodlanan Genler

İşlevi	Gen sayısı
Genetik sistemle ilgili genler	
rRNAs (23S, 16S, 5S, 4.5S)	4
tRNAs	30
Ribozomal proteinler	21
RNA polimeraz alt birimleri	4
Fotosentez genleri	
Fotosistem I	5
Fotosistem II	12
Sitokrom *bf* kompleksi	4
ATP sentaz	6
Ribuloz bisfosfat karboksilaz	1

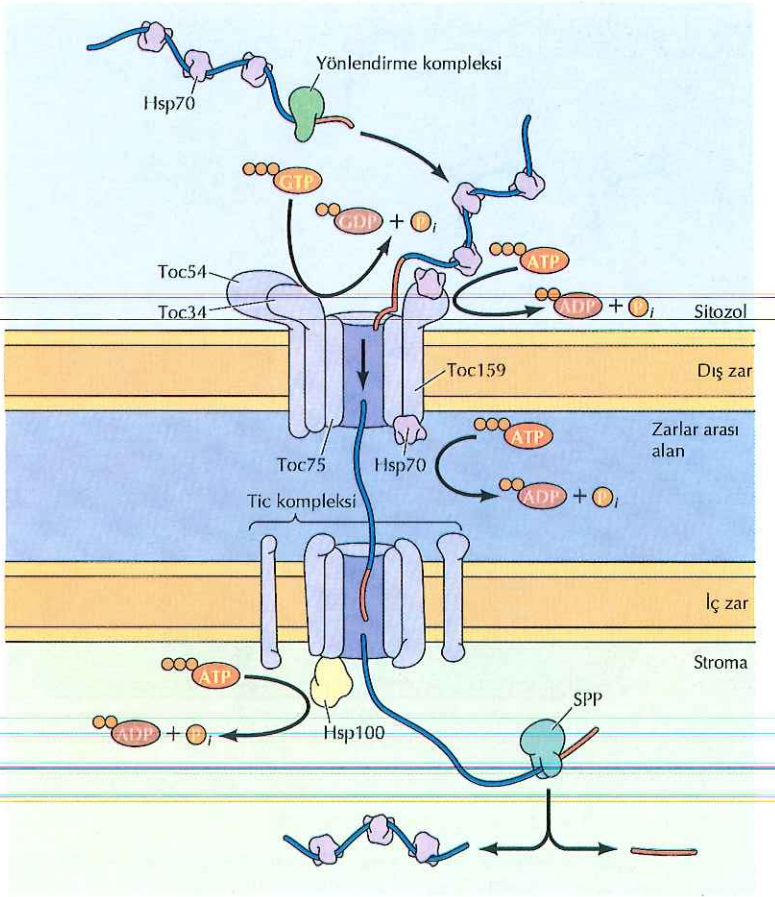
Dizin analizleri kloroplast genomunun, burada listelenenler dışında yaklaşık 30 gen daha içerdiğini gösteriyor. Bunlardan bazıları solunumda görevli proteinleri kodlamakta, ancak çoğu henüz tanımlanmamış durumda.

Kloroplast genomu, fotosentezde görev alan 30 kadar proteini de kodlar, fotosistem I ve II'nin, sitokrom bf kompleksinin ve ATP sentazın bileşenleri bunların arasındadır. Ayrıca, ribuloz bisfosfat karboksilazın (rubisco) alt birimlerinden birisi de kloroplast DNA'sı tarafından kodlanır. Rubisco, Calvin döngüsünde CO_2'nin ribulose-1,5-bisfosfat'a bağlanmasını katalizleyen önemli bir enzimdir (bkz. Şekil 2.39). Sadece, kloroplast stromasında en fazla bulunan bileşen olarak değil, aynı zamanda yeryüzünde en fazla bulunan yegane protein olduğu sanıldığı için de, bir alt biriminin kloroplast genomundan kodlandığı belirtilmeye değer.

Kloroplast Proteinlerinin İçeri Alınması ve Dağıtımı

Kloroplastlar mitokondrilere göre, kendi proteinlerinin daha büyük bir kısmını kodlamalarına karşın, kloroplast proteinlerinin yaklaşık 3,500'ü ya da %95'i hala nükleer genlerden kodlanır. Mitokondrilerde olduğu gibi, bu proteinler sitozoldeki ribozomlarda sentezlenirler ve kloroplast içerisine tamamlanmış polipeptid zincirleri olarak alınırlar. Daha sonra bunlar, kloroplastların içerisinde uygun yerleşim bölgelerine dağıtılırlar- bu iş, kloroplastların üç ayrı zar sistemlerinin bulunması ve bunların üç ayrı iç bölme oluşturmaları nedeniyle mitokondrilerdeki protein dağıtımından çok daha zordur.

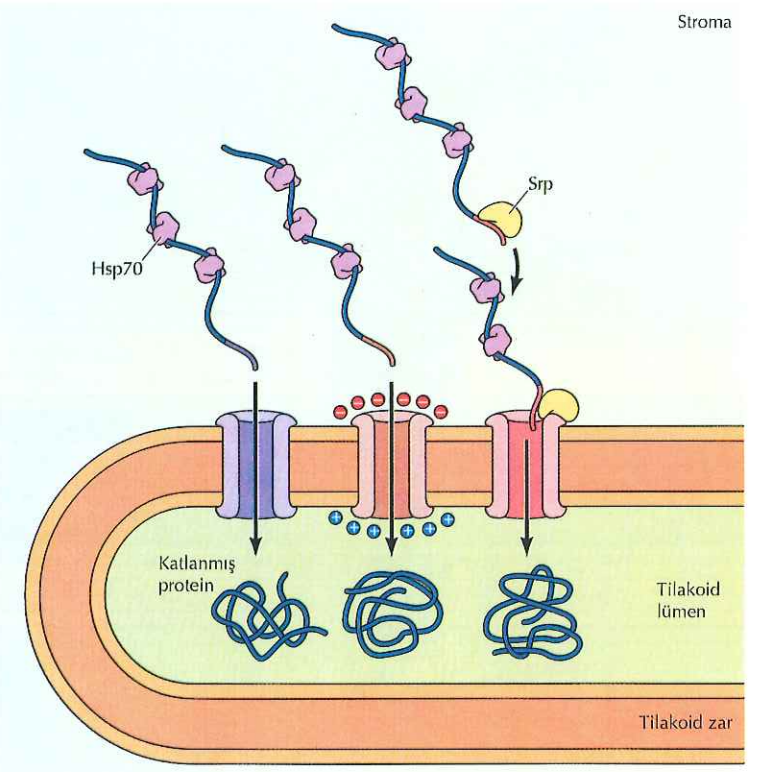
Proteinler, kloroplastların içine alınmak üzere, N- ucunda bulunan, 30 ila 100 amino asitten oluşan, **transit peptidleri** denilen ve proteinlerin kloroplast zarfının iki zarından geçmelerini sağladıktan sonra proteolitik kesimle uzaklaştırılan dizinlerle hedeflenirler (Şekil 10.15). Transit peptidini ilk tanıyan yönlendirme kompleksi bunları, kloroplast dış zarındaki bir yer-değiştirme kompleksine (**Toc kompleksi**) iletir ve Toc 159 reseptörlerine bağlanmalarını sağlar. Mitokondri protein alımındaki öncül dizilerden farklı olarak transit peptidler pozitif yüklü değildir ve kloroplast iç zarı güçlü bir elektrik potansiyel taşımaz. Kloroplastlara protein alımında ön-proteini katlanmamış durumda korumak için Hsp70 molekülleri gerekir. Hsp70 molekülleri aynı zamanda Toc kompleksine bağlanarak, ATP



Şekil 10.15 Proteinlerin kloroplast stromasına alınması
N-ucunda transit peptide sahip proteinler, kendilerini kloroplast dış zarındaki Toc kompleksine gönderecek olan bir yönlendirme kompleksi tarafından tanınırlar. Transit peptidi, Toc75 giriş kanalına geçmeden önce Hsp70 ile ilişkili olan Toc159'a bağlanır. Dış zardan geçiş, zarlar arası alanda Hsp70 tarafından ATP hidrolizini ve olasılıkla Toc34 tarafından GTP hidrolizini de gerektirir. Bir kez kloroplast dış zarını geçince, transit peptidi iç zardaki Tic kompleksine aktarılır. Ön-protein, Hsp100 tarafından, Tic kompleksinin içinden geçirilerek alınır. Stromada, transit peptidi stroma işlemci peptidazı (SPP) tarafından uzaklaştırılır ve protein Hsp70'e bağlanır.

hidroliziyle proteinin içeriye alınmasını sağlarlar. En az bir Toc proteini, Toc34, GTP bağlar ve GTP'nin hidrolizi taşıma için ek bir enerji kaynağı olabilir. Preproteinler Toc kompleksi yoluyla taşınmalarının ardından iç zardaki yer-değiştirme kompleksine **(Tic kompleksi)** aktarılırlar ve iç zardan geçirilerek stromaya taşınırlar. Toc, Tom ve Tim kopleksleri gibi Tic kompleksi de bir veya daha fazla protein kanalı olan bir multiprotein kompleksidir. Olasılıkla birden fazla Tic kompleksi tipi bulunduğu için, özel proteinleri hakkında çok az bilgi vardır. Hsp100 ailesinden (Bölüm 7'de tartışılan Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 ailelerine ek olarak diğer bir şaperon ailesi) bir şaperon, Tic kompleksinin stromal bölümüne bağlıdır. Bu, kloroplasta özgü Hsp100, ön-proteini iç zardan alır. Transit peptidi stromada, **stroma işlemci peptidazı (SPP)** tarafından kesilir ve protein stromadaki Hsp70 şaperonuna bağlanır. Mitokondri matriksinde olduğu gibi, stromada kalacak olan bazı proteinler bir Hsp60 şaperonini içerisinde katlanmalarını tamamlarlar.

Proteinlerin iç ve dış kloroplast zarlarına nasıl yerleştirildikleri konusu çok az bilinmektedir. Mitokondrilerdeki gibi, bazı proteinler, direkt olarak, kloroplast zarfındaki dış zarın içerisine yerleşir. Benzer şekilde, tilakoid zara hedeflenmiş bazı proteinler, stromada katlandıktan sonra direkt olarak zarın içine katılırlar. Tilakoit lümen



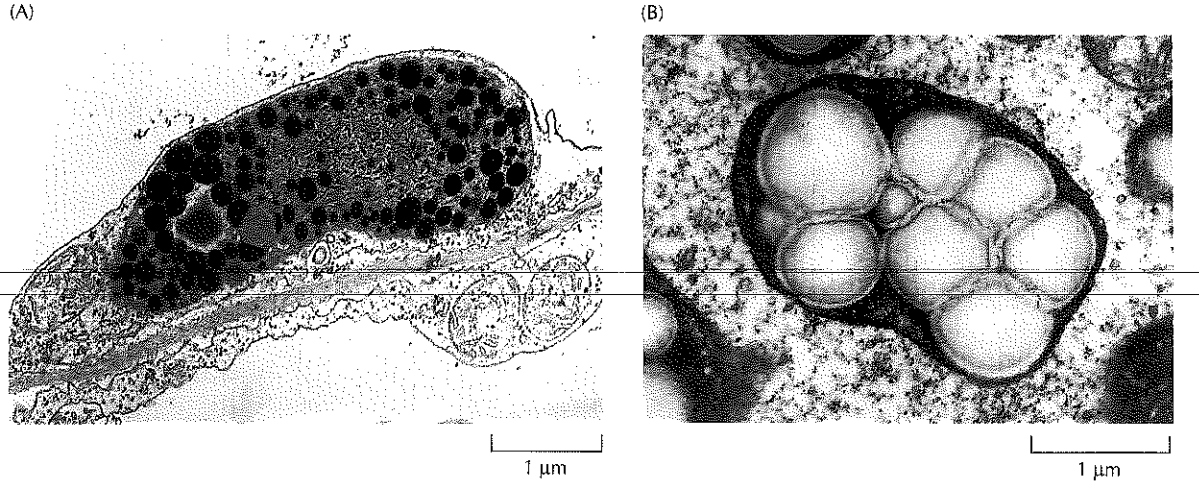
Şekil 10.16 Proteinlerin tilakoid lümen içerisine alınması
Proteinleri stromadan tilakoid lümene taşıyan üç farklı zar kompleksi bulunur. Stromadaki Hsp70'e bağlanan katlanmamış proteinler her komplekse, özgün N-ucu sinyalleriyle yönlendirilirler. Komplekslerden biri tilakoid zarın iki yanında bir proton gradientine gerek duymazken, ikinci kompleks gerek duyar. Üçüncü bir kompleks, sitozolde sentezlenen bazı proteinler gibi, kloroplast ribozomlarında sentezlenen proteinlere de bağlanan ve stromada bulunan bir sinyal tanıma partikülünü algılar.

içerisine katılacak olan proteinler hedeflerine iki aşamada taşınırlar. Önce, anlatıldığı şekilde, stromaya alınırlar, daha sonra, transit peptidin kesilmesiyle açığa çıkan ikinci bir sinyal dizin tarafından tilakoid zarı geçmek üzere hedeflenirler. Proteinler, üç farklı taşıma kompleksinden geçerek tilakoid lümene aktarılırlar (Şekil 10.16). Translokasyon komplekslerinden biri tilakoid zarın iki yanındaki proton gradientinden bağımsızken, bir diğeri proton gradientine gereksinim duyar. Proteinler, kloroplast genomunun kodladığı, kloroplast ribozomlarında sentezlenen proteinleri de tanıyan, stromadaki bir sinyal tanıma partikül tarafından üçüncü yer-değiştirme kompleksine hedeflenirler.

Diğer Plastidler

En tanınmışı olmakla birlikte kloroplastlar, **plastidler** adı verilen, büyük bir bitki oganelleri ailesinin yalnızca bir üyesidir. Tüm plastidler kloroplastlarla aynı genoma sahiptirler, ancak, yapı ve işlev yönleriyle farklılık gösterirler. Kloroplastlar fotosentez için özelleşmişlerdir ve iç tilakoid zar sistemine sahip olmalarıyla ayrıcalıklıdırlar. Bitki hücresi metabolizmasının farklı yönlerinde görev alan diğer plastidler, plastid zarfının iki zarıyla çevrilmişlerdir ancak, tilakoid zarlara ve fotosentez aygıtının diğer bileşenlerine sahip değillerdir.

Farklı plastid tipleri genellikle içerdikleri pigmentlerin çeşidine göre sınıflandırılırlar. Kloroplastlar klorofil içerdikleri için böyle adlandırılmışlardır. **Kromoplastlar** (Şekil 10.17A) klorofilden yoksundurlar fakat karotenoidler içerirler, bazı çiçeklerin ve

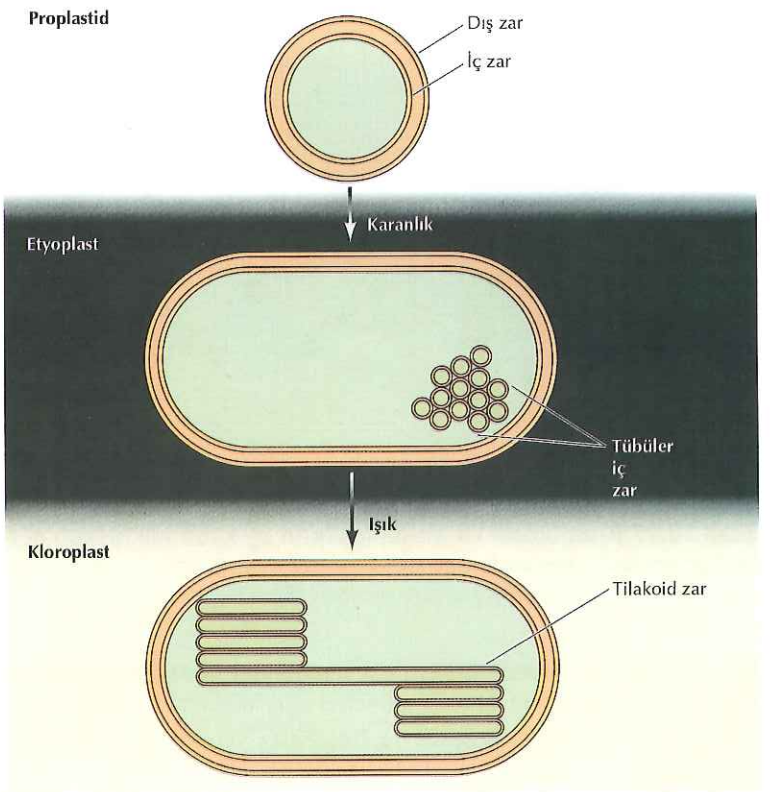


Şekil 10.17 Kromoplast ve amiloplastların elektron mikroskop görüntüleri
(A) Kromoplastlar içerisinde karotenoidlerin depolandığı lipid damlacıklar içerir. (B) Amiloplastlar büyük nişasta granüllerine sahiptir. (A, Biophoto Associates/ Photo Researchers, Inc.; B, Dr. Jeremy Burgess/ Photo Researchers, Inc.)

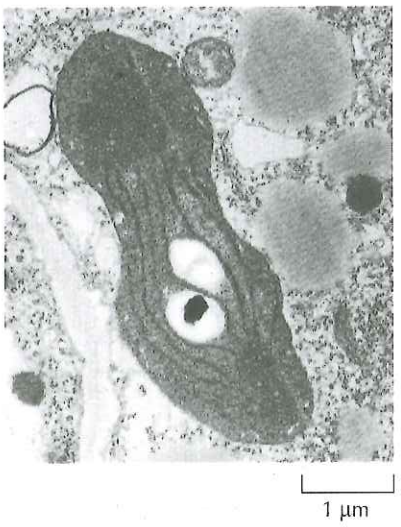
meyvelerin sarı, turuncu ve kırmızı renklerinin nedenidirler ancak, hücre metabolizmasındaki esas görevleri açık değildir. **Lökoplastlar** pigment içermeyen plastidlerdir ve fotosentez yapamayan dokularda çeşitli enerji kaynaklarını depolarlar. **Amiloplastlar** (Şekil 10.17B) ve **elayoplastlar** lökoplast örnekleridir ve sırasıyla nişasta ve lipid depolarlar.

Kloroplastlar dahil tüm plastidler, bitki kök ve filizlerindeki hızlı bölünen hücrelerde bulunan, küçük (çapı 0.5 ila 1 µm), farklılaşmamış organellerden, proplastid'lerden türerler. Proplastidler daha sonra, farklılaşan hücrenin gereksinimleri doğrultusunda, çeşitli tipte olgun plastidlere dönüşürler. Ayrıca, olgun plastidler bir tipten diğerine değişebilirler. Örneğin, meyvelerin (örn., domates) olgunlaşması sırasında kloroplastlardan kromoplastlar gelişir. Bu olay sırasında, yeni tip karotenoidler sentezlenirken klorofil ve tilakoid zarlar yıkılır.

Plastidlerin ilginç bir özelliği de, gelişimlerinin hem çevresel sinyallerle hem de hücre farklılaşmasının doğal programıyla kontrol edilmesidir. Örneğin, yaprakların fotosentetik hücrelerinde proplastidler kloroplastlara gelişir (Şekil 10.18). Bu süreçte, plastid zarfının iç zarından tomurcuklanan veziküller tilakoid zarı oluştururken, fotosentez sisteminin çeşitli komponentleri sentezlenir ve birleştirilir. Ancak, kloroplastlar sadece ışık varlığında gelişirler. Bitkiler karanlıkta tutulacak olursa, yapraklardaki proplastidlerin gelişimi, iç zar tübüllerinin yarı kristal kümeler oluşturdukları ancak klorofilin sentezlenmediği bir ara kademede (**etyoplastlar** denir) kalır (Şekil 10.19). Karanlıkta büyütülmüş bitki daha sonra ışığa tutulacak olursa, etyoplastlar kloroplast oluşturmak üzere gelişmeye devam ederler. Plastid gelişiminin bu şekilde çifte kontrolünün, hem nükleus hem de plastid genomundaki genlerin koordine ekspresyonunu gerektirdiğini belirtmek doğru olur. Böyle koordine bir gen ekspresyonunun altında yatan mekanizmaların büyük bölümü bilinmiyor ve bunların aydınlatılması bitki moleküler biyolojisinde zorlu bir problemi gündeme getirir.



Şekil 10.18 Kloroplast gelişimi
Yapraklardaki fotosentetik hücrelerde proplastidlerden kloroplastlar gelişir. Proplastidler sadece zarfın iç ve dış zarlarına sahiptir; tilakoid zar kloroplast gelişimi sırasında iç zardan tomurcuklanan veziküllerden oluşur. Bitki karanlıkta tutulacak olursa kloroplast gelişimi bir ara kademede durur (etyoplastlar). Etyoplastlar klorofilden yoksundur ve yarı kristal şekilde dizilmiş zar tübülleri içerirler. Işık varlığında, kloroplastları oluşturmak üzere gelişimlerini sürdürürler.



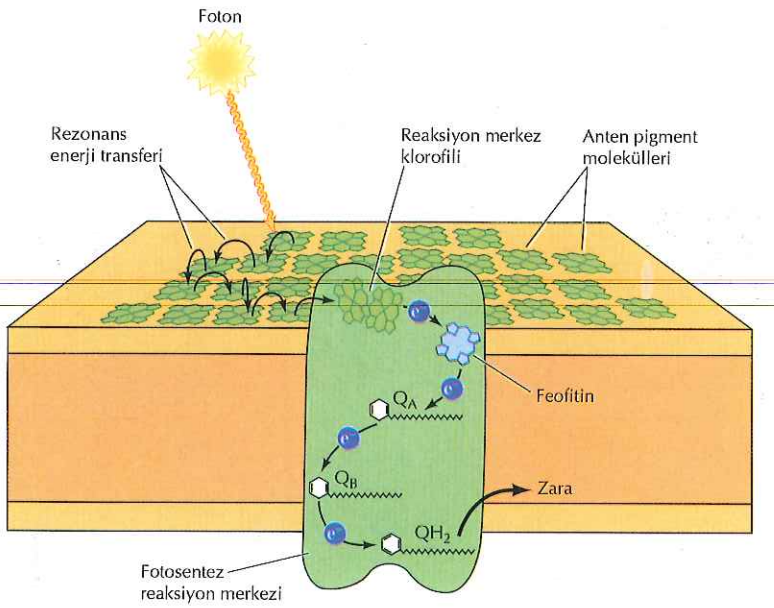
Şekil 10.19 Etyoplastın elektron mikroskop görüntüsü
(John N.A. Lott/Biological Photo Service)

Fotosentez

Fotosentez sürecinde güneş ışığından elde edilen enerji, CO_2 ve H_2O'dan glukozun yapımını gerçekleştirmek için kullanılır. Güneş ışığının enerjisini, kullanılabilir potansiyel kimyasal enerji formuna çevirebilmesi nedeniyle fotosentez tüm biyolojik sistemler için en büyük enerji kaynağıdır. Fotosentez iki ayrı aşamada gerçekleşir. Işık reaksiyonlarında, güneş enerjisi H_2O'dan O_2 oluşumuyla eşlenen ATP ve NADPH yapımına güç sağlar. Güneş ışığı gerekmediği için karanlık reaksiyonlar olarak adlandırılan aşamada, ışık reaksiyonlarıyla üretilen ATP ve NADPH glukoz sentezini yürütür. Ökaryotik hücrelerde ışık ve karanlık reaksiyonların her ikisi de, ışık reaksiyonları tilakoid zarda, karanlık reaksiyonlar stromada olmak üzere, kloroplastların içerisinde gerçekleşir. Bu bölümde, mitokondrideki oksidatif fosforilasyon ile benzer olan ışık reaksiyonları tartışılacaktır. Karanlık reaksiyonlar ise Bölüm 2'de detaylı olarak anlatılmıştır.

Fotosistem I ve II'den Elektron Akışı

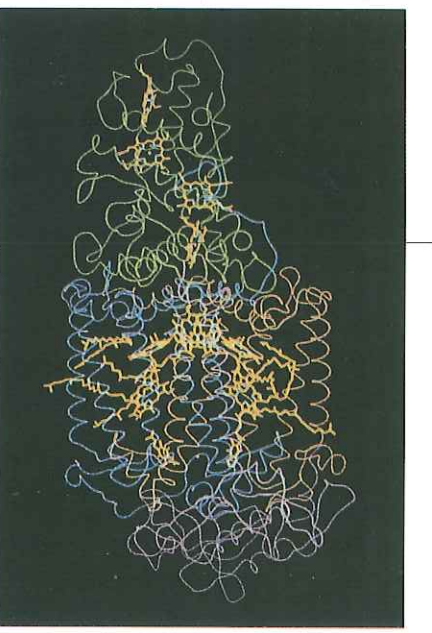
Güneş ışını fotosentez pigmentleri tarafından soğurulur, bitkilerde bunlardan en yaygın olarak bulunanı **klorofil**dir. Işığın soğurulması bir elektronu daha yüksek enerji düzeyine çıkarır ve böylece güneş ışığının enerjisi potansiyel kimyasal enerjiye dönüştürülmüş olur. Fotosentez pigmentleri tilakoid zarda **fotomerkezler** şeklinde organize olurlar ve bunların her birinde yüzlerce pigment molekülü yer alır (Şekil 10.20).



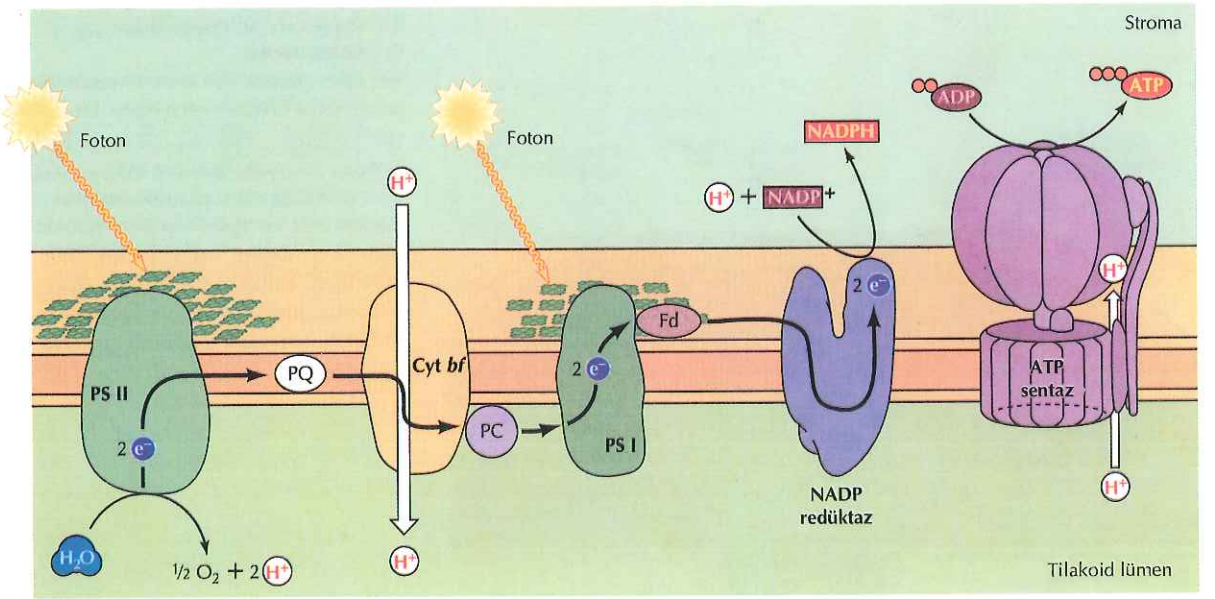
Şekil 10.20 Foto-merkezin organizasyonu
Her foto-merkez, fotonları soğuran ve enerjisini bir reaksiyon merkez klorofiline aktaran yüzlerce anten pigmentini içerir. Daha sonra, reaksiyon merkez klorofili, uyarılmış elektronu elektron taşıma zincirindeki bir alıcıya aktarır. Şekilde görülen reaksiyon merkezi fotosistem II'ye aittir, burada elektronlar reaksiyon merkez klorofilinden, önce feofitine ondan da kinonlara (QA, QB ve QH_2) aktarılır.

Her foto-merkezdeki çok sayıda pigment molekülü birer anten görevi yaparak ışığı soğurur ve uyarılmış elektronların enerjisini, reaksiyon merkezi olarak çalışan bir klorofil molekülüne aktarır. Reaksiyon merkez klorofili daha sonra bu yüksek enerjili elektronu elektron taşıma zincirindeki bir alıcı moleküle aktarır. Yüksek enerjili elektronlar zardaki bir dizi taşıyıcıdan geçirilirken ATP ve NADPH üretilir.

En iyi tanımlanmış olan fotosentez reaksiyon merkezi *Rhodopseudomonas viridis* bakterisininkidir ve yapısı Johann Deisenhofer, Hartmut Michel, Robert Huber ve arkadaşları tarafından 1985'de belirlenmiştir (Şekil 10.21). Reaksiyon merkezi, zarın dış kısmında bir *c*-tipi sitokroma bağlanan üç transmembran polipeptidden oluşur. Güneş ışınının enerjisi, özel çift olarak bilinen bir çift klorofil molekülü tarafından tutulur. Elektronlar daha sonra özel çiftten, diğer bir klorofil çiftine ve oradan da diğer prostetik gruplara (feofitin ve kinonlar) aktarılır. Elektronlar buradan da, elektron taşınımının proton gradienti oluşumuyla eşlendiği bir sitokrom *bc* kompleksine iletilir. Elektronlar, buradan reaksiyon merkez sitokromuna iletilirler ve sonra nihayet özel çift klorofillerine geri dönerler. Böylece reaksiyon merkezi, güneş ışınının enerjisini yüksek-enerjili elektronlara aktarır, elektronlardaki potansiyel enerji sitokrom *bc* kompleksinde bir proton gradientine dönüştürülür.



Şekil 10.21 Bir fotosentez reaksiyon merkezinin yapısı
R.viridis'in reaksiyon merkezi üç transmembran protein (mor,mavi ve bej) ile c-tipi sitokromdan (yeşil) oluşur. Klorofiller ve diğer prostetik gruplar sarı renktedir. (Johann Deisenhofer'in nazik katkısı, University of Texas Medical Center and The Nobel Foundation, 1989)



Şekil 10.22 Fotosentezde elektron taşınımı ve ATP sentezi
Elektron taşınımında ve ATP ile NADPH'ın sentezinde tilakoid zardaki beş protein kompleks görev yapar. Fotonlar, fotosistem I ve II (PS I ve PS II)'ye bağlı bulunan pigment molekül kompleksleri tarafından soğurulur. Fotosistem II'de foton soğurulmasından çıkan enerji tilakoid lümen içinde bir su molekülünün ayrıştırılmasında kullanılır. Elektronlar daha sonra plastokinon (PQ) tarafından sitokrom bf kompleksine taşınır ve burada elektronlar daha düşük enerji düzeyine indirilirken tilakoid lümene protonlar pompalanır. Daha sonra elektronlar plastosiyanin (PC) aracılığıyla fotosistem I'e taşınır. Fotosistem I'de tekrar ışın soğurulmasıyla elde edilen enerji yüksek enerjili elektronları oluşturur, bu elektronlar ferrodoksine (Fd) iletilerek stromada $NADP^+$'nin NADPH'a indirgenmesi için kullanılır. ATP sentaz, proton gradientinde tutulan enerjiyi ADP'yi ATP'ye dönüştürmek için kullanır.

Bitkilerde, fotosentez ışık reaksiyonlarında görevli proteinler tilakoid zarda beş kompleks tarzında düzenlenirler (Şekil 10.22). Bu komplekslerden ikisi fotosistemlerdir (**fotosistem I** ve **II**) ve burada ışık soğurulur ve reaksiyon merkez klorofillerine aktarılır. Daha sonra yüksek enerjili elektronlar, her iki fotosistemde ve üçüncü bir protein kompleks olan **sitokrom *bf* kompleksinde** yer alan bir dizi taşıyıcıdan geçirilir. Mitokondrilerde olduğu gibi, elektronların taşınması protonların tilakoid lümene aktarılmasına eşlenir ve böylece tilakoid zarın her iki yanında bir proton gradienti oluşur. Proton gradientinde depolanan enerji, zardan protonların geri dönmesiyle ATP sentezini birleştiren (mitokondrideki gibi) ve tilakoid zardaki dördüncü kompleks olan ATP sentaz tarafından elde edilir.

Kloroplastlardaki elektron taşınımının mitokondrilerdekinden önemli bir farkı, güneş ışınından sağlanan enerjinin sadece ATP'ye dönüştürülmeyip, daha sonra CO_2'nin karbohidratlara dönüşmesi için gerekecek olan NADPH'ın üretimi için de kullanılmasıdır. Bu, fotosentez ışık reaksiyonlarında, biri ATP diğeri NADPH üreten iki farklı fotosistemin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Elektronlar iki fotosistemden ardışık olarak geçirilir, fotosistem I NADPH üretimini üstlenirken fotosistem II ATP üretimini sağlar.

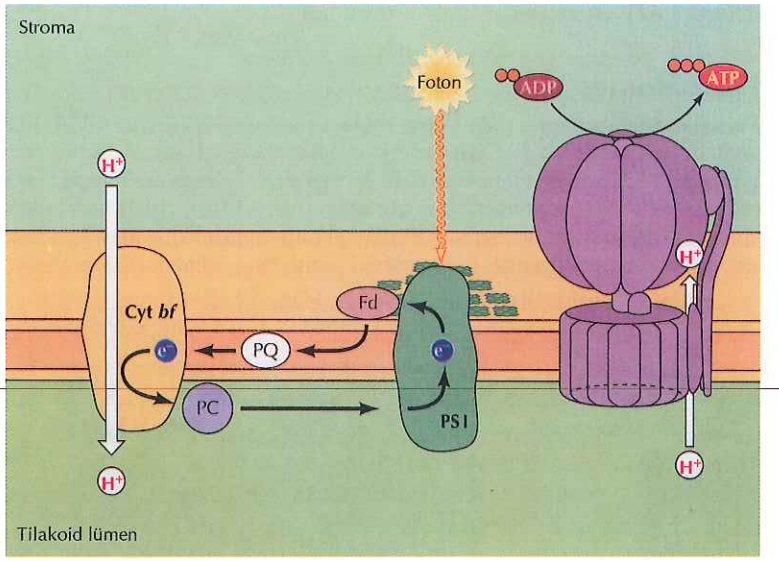
Elektron akış yolağı, daha önce bahsettiğimiz *R. viridis*'in fotosentez reaksiyon merkezine homolog olan fotosistem II'de başlar. Ancak, fotosistem II'de fotonların soğurulmasından elde edilen enerji, su moleküllerini oksijen ve protonlara ayrıştırmak için kullanılır (bkz. Şekil 10.22). Bu reaksiyon tilakoid lümende gerçekleşir ve H_2O'dan protonların serbest kalması tilakoid zar çevresinde proton gradienti oluşumunu sağlar. Bu işlemde elde edilen yüksek enerjili elektronlar bir dizi taşıyıcıdan geçirilerek, mitokondrideki koenzim Q (ubikinon)'a benzeyen ve yağda çözünen bir taşıyıcı olan plastokinona aktarılır. Plastokinon elektronları fotosistem II'den sitokrom *bf*'ye taşır, burada elektronlar plastosiyanine aktarılırken tilakoid lümene bir

miktar daha proton pompalanır. Fotosistem II'den elektron akışı böylece, kemiozmotik ATP sentezini sağlayacak olan bir proton gradientinin oluşması ile eşlenir.

Elektronlar fotosistem II'den plastosiyanin (bir periferal zar proteini) aracılığıyla fotosistem I'e taşınır ve burada, yeni ek foton soğurulması yüksek enerjili elektron oluşumunu tetikler. Ancak, fotosistem I proton pompası işlevi görmez, bunun yerine yüksek enerjili elektronları $NADP^+$'nin NADPH'a indirgenmesi için kullanır. Fotosistem I'in reaksiyon merkez klorofili uyarılmış elektronlarını bir dizi taşıyıcıdan geçirerek, tilakoid zarın stroma tarafında bulunan küçük bir protein olan ferrodoksin'e iletir. Daha sonra, **NADP redüktaz** enzimi elektronları ferrodoksin'den $NADP^+$'ye aktararak NADPH oluşturur. Böylece, elektronların fotosistem I ve II'den geçişleri sonucunda hem ATP hem de NADPH oluşur ve bunlar kloroplast stromasında Calvin döngüsü enzimleri tarafından CO_2 nin karbohidratlara dönüştürülmesinde kullanılır (bkz. Şekil 2.39).

Döngüsel Elektron Akışı

Döngüsel elektron akışı adı verilen ikinci bir elektron taşıma yolağında NADPH sentezlenmeden sadece ATP üretir, böylece diğer metabolik işlemler için fazladan ATP sağlanır. Döngüsel elektron akışında, fotosistem I'de elde edilen ışık enerjisi NADPH sentezinde değil ATP sentezinde kullanılır (Şekil 10.23). Yüksek enerjili elektronlar fotosistem I'den $NADP^+$'ye değil sitokrom *bf* kompleksine aktarılır. Sitokrom *bf* içerisinden elektronların aktarımı, fotosistem II'de olduğu gibi, tilakoid zarın iki yanında bir proton gradienti oluşmasıyla eşlenir. Daha sonra plastosiyanin bu elektronları daha düşük enerji düzeyinde fotosistem I'e aktarır, böylece, fotosistem I'de



Şekil 10.23 Döngüsel elektron akış yolağı
Fotosistem I (PSI)'de soğurulan ışık enerjisi NADPH yerine ATP sentezinde kullanılır. Foton soğurulmasıyla elde edilen yüksek enerjili elektronlar $NADP^+$'ye değil sitokrom *bf* kompleksine aktarılır. Sitokrom *bf* kompleksinde elektronlar daha düşük enerjili duruma geçirilirken protonlar tilakoid lümene pompalanır. Elektronlar daha sonra plastosiyanin (PC) tarafından fotosistem I'e geri döndürülür.

elde edilen ışık enerjisinin sitokrom *bf* kompleksinde protonların pompalanmasında kullanıldığı bir elektron taşıma döngüsünü sonlandırır. Böylece, hücrenin gereksinimine göre, elektronların fotosistem I'den geçişi ATP ya da NADPH üretebilir.

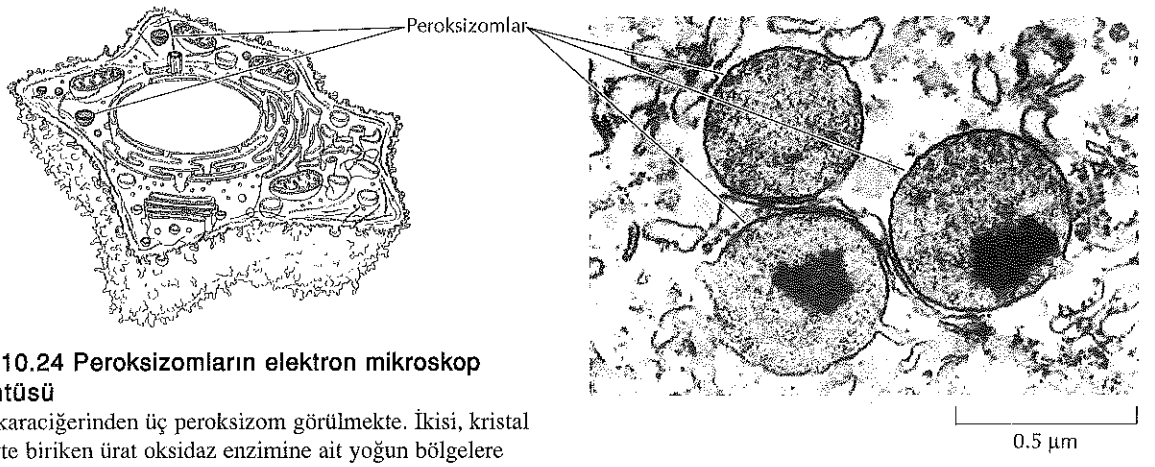
ATP Sentezi

Tilakoid zardaki ATP sentaz mitokondrideki enzimle benzerdir. Bununla birlikte, tilakoid zarın iki yanında oluşan proton gradientinde depolanan enerji, iç mitokondri zarındakinin aksine, hemen tümüyle kimyasal özelliktedir. Bunun nedeni, tilakoid zarın protonları geçirmemesine karşın, iç mitokondi zarından farklı olarak diğer iyonlara, özellikle Mg^{2+} ve Cl^-'e geçirgenliğinin olmasıdır. Bu iyonların serbest geçişi proton gradientinin voltaj bileşenini nötralize eder, bu nedenle, fotosentezden elde edilen enerji, tilakoid zarın iki yanında proton konsantrasyon (pH) farkı yaratılarak tutulur. Ancak, tilakoid lümen kapalı bir bölme olduğu için proton konsantrasyon farkı oldukça büyük olabilir ve bu, tilakoid lümen ile stroma arasında üç pH biriminden daha büyük pH farklılığı bulunuşuyla uyumludur. pH farkının büyüklüğü nedeniyle tilakoid zar boyunca depolanan toplam serbest enerji, iç mitokondri zarında depolanana yakındır.

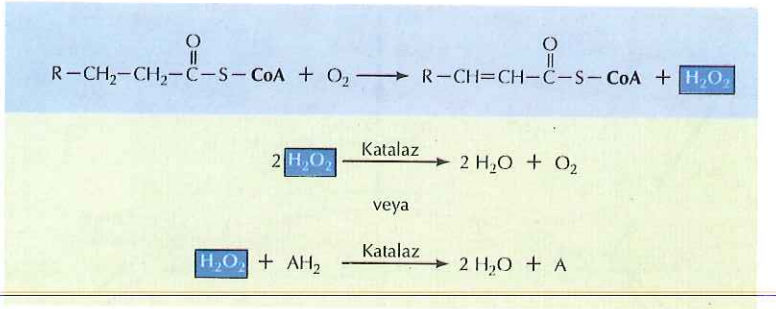
Taşınan her bir çift elektron için tilakoid zardan, fotosistem II'de iki proton ve sitokrom *bf* kompleksinden iki ila dört proton pompalanır. Bir molekül ATP sentezini desteklemek için dört proton gerektiğinden, fotosistem I ve II'den döngüsel olmayan elektron akışıyla geçen her bir çift elektron 1 ila 1.5 arasında ATP molekülü sağlar. Döngüsel elektron akışının getirisi daha azdır, bir çift elektron için 0.5 ila 1 arasında ATP molekülü verir.

Peroksizomlar

Peroksizomlar küçük, zarla çevrili organellerdir (Şekil 10.24), enerji metabolizmasının bazı yönleri dahil çeşitli metabolik reaksiyonlarda görev alan enzimleri içerirler. Peroksizomlar morfolojik olarak lizozomlara benzemekle birlikte, mitokondri ve kloroplastlarda olduğu gibi, serbest ribozomlarda sentezlenen ve peroksizom içerisine



Şekil 10.24 Peroksizomların elektron mikroskop görüntüsü
Sıçan karaciğerinden üç peroksizom görülmekte. İkisi, kristal özellikte biriken ürat oksidaz enzimine ait yoğun bölgelere sahip. (Don Fawcett/Photo Researches, Inc.)



Şekil 10.25 Peroksizomlarda yağ asidi oksidasyonu
Yağ asitlerinin oksidasyonuna, oksijenden hidrojen peroksid (H_2O_2) oluşumu eşlik eder. Hidrojen peroksid katalaz tarafından, suya dönüştürülerek ya da diğer organik bileşikleri (AH2 olarak gösterilen) oksitleyerek, ayrıştırılır.

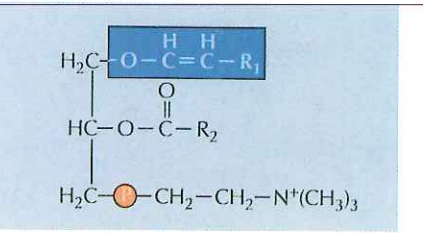
tamamlanmış polipeptid zincirleri olarak alınan proteinlerden oluşurlar. Kendi genomları bulunmamasına karşın peroksizomlar bölünerek çoğalmalarıyla mitokondri ve kloroplastları andırırlar. Bir çok insan hücresi 500 kadar peroksizom barındırır.

Peroksizomların İşlevleri

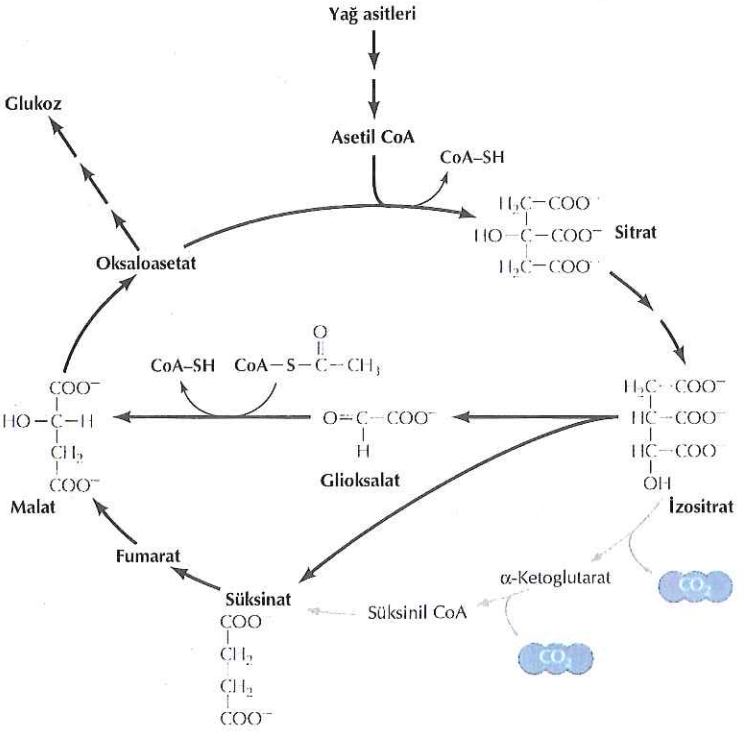
Peroksizomlar, farklı tip hücrelerde çeşitli biyokimyasal yolaklarda görev alan en az 50 farklı enzim barındırırlar. Başlangıçta peroksizomlar, hidrojen peroksid üretimine yönelik oksidasyon reaksiyonlarının yer aldığı organeller olarak tanımlanmıştır. Hidrojen peroksidin hücre için zararlı olması nedeniyle peroksizomlar aynı zamanda, hidrojen peroksidi, suya dönüştürerek veya diğer organik bileşikleri oksitlemek amacıyla kullanarak ayrıştıran **katalaz** enzimini de içerirler. Ürik asit, amino asitler, pürinler, metanol ve yağ asitleri gibi çeşitli sübstratlar peroksizom içerisinde bu gibi oksidatif reaksiyonlarla yıkılırlar. Yağ asitlerinin oksidasyonu (Şekil 10.25), metabolik enerjinin en büyük kaynağı olması nedeniyle özel öneme sahip bir örnektir. Hayvan hücrelerinde yağ asitleri hem peroksizomlarda hem de mitokondride oksitlenirken, maya ve bitki yağ asitlerinin yükseltgenmesi peroksizomlarla sınırlıdır.

Yükseltgenme reaksiyonları için bir bölme sağlamalarının yanı sıra, peroksizomlar lipidlerin ve lizin amino asidinin biyosenteziyle de ilgilidirler. Hayvan hücrelerinde kolesterol ve dolikol ER ile birlikte peroksizomlarda da sentezlenir. Peroksizomlar, karaciğerde kolesterolden türetilen safra asitlerinin sentezinde de görev alırlar. Peroksizomlar ayrıca, hidrokarbon zincirlerinden biri gliserolle ester bağı yerine eter bağı yapan (Şekil 10.26) fosfolipidler ailesinden **plazmalojenleri** sentezleyen enzimleri de barındırırlar. Plazmalojenler, her dokuda bulunmamakla birlikte, özellikle kalp ve beyin olmak üzere bazı dokularda önemli zar bileşenleridirler. Peroksizomlar farklı dokularda farklı biyokimyasal reaksiyonları yürütürler. Ancak, bir hücredeki tek ya da sınırlı sayıda işlemde özelleşmiş peroksizom alt gruplarının bulunup bulunmadığı henüz bilinmemektedir.

Peroksizomların bitkilerde özellikle önemli iki işlevi vardır. Birincisi, tohumda bulunan peroksizomların depolanmış yağ asitlerinin karbohidratlara çevrilmesinden sorumlu olmalarıdır ki,



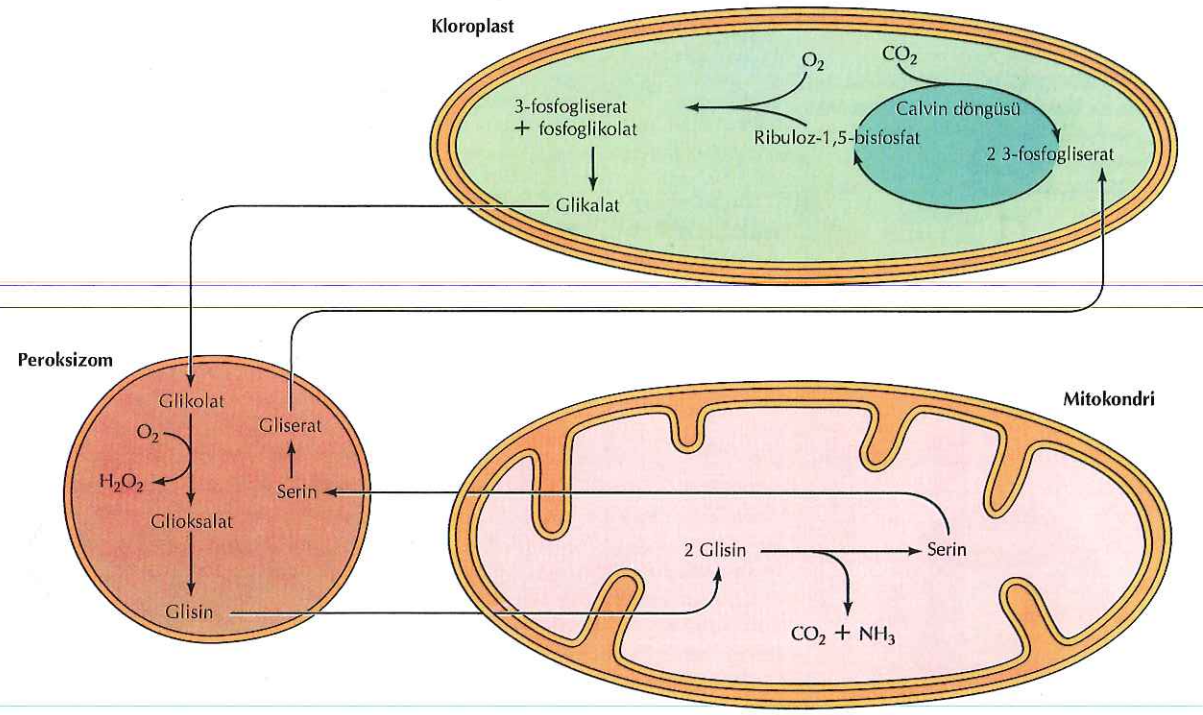
Şekil 10.26 Plazmalojen'in yapısı
Görülen plazmalojen fosfatidil kolin benzeridir. Ancak, yağ asidi zincirlerinden biri gliserole ester yerine eter bağıyla bağlanmıştır.



Şekil 10.27 Glioksalat döngüsü
Bitkiler, sitrik asit döngüsünün (bkz. Şekil 2.34) bir benzeri olan glioksalat döngüsü ile yağ asitlerinden karbohidratları sentezleyebilirler. Sitrik asit döngüsündeki gibi, asetil CoA oksaloasetat ile birleşerek sitrat oluşturur, bu da izositrata dönüştürülür. Ancak, CO_2 ve α-ketoglutarata yıkılacak yerde (gri oklar), izositrat süksinat ve glioksalata çevrilir. Daha sonra glioksalat diğer bir asetil CoA molekülüyle etkileşerek malat oluşturur ve o da oksaloasetata dönüştürülerek glukoz sentezinde kullanılır.

filizlenen bitkinin büyümesi için gerekli enerji ve ham maddenin sağlanması açısından son derece önemlidir. Bu, **glioksilat döngüsü** adı verilen ve sitrik asit döngüsünün benzeri olan bir dizi reaksiyonlarla gerçekleşir (Şekil 10.27). İçinde bu döngünün yer aldığı peroksizomlar bazen **glioksozom** olarak adlandırılır.

İkinci olarak, yapraktaki peroksizomlar, fotosentez sırasında ortaya çıkan bir yan ürünü metabolize eden **fotosolunum** ile ilgilidirler (Şekil 10.28). Fotosentez sırasında CO_2 Calvin döngüsü denilen bir dizi reaksiyonla karbohidratlara dönüştürülür (bkz. Şekil 2.39). İlk aşama, CO_2'in iki molekül 3- fosfogliserat (her birinde üç karbon) oluşturmak üzere beş-karbonlu şeker ribuloz 1,5- bisfosfat'a eklenmesidir. Ancak bazen, ilgili enzim (ribuloz bisfosfat karboksilaz ya da rubisco) CO_2 yerine O_2 bağlanmasını katalizleyerek bir molekül 3-fosfogliserat ve bir molekül fosfoglikolat (iki karbonlu) oluşturur. Bu bir yan reaksiyondur ve fosfoglikolat kullanılan bir ürün değildir. Önce glikolata dönüştürüldükten sonra peroksizomlara aktarılır ve burada oksitlenerek glisine çevrilir. Daha sonra mitokondriye taşınan iki glisinden, CO_2 ve NH_3 kaybıyla bir molekül serin oluşturulur. Daha sonra peroksizoma iletilen serin burada gliserat'a çevrilir. Son olarak,

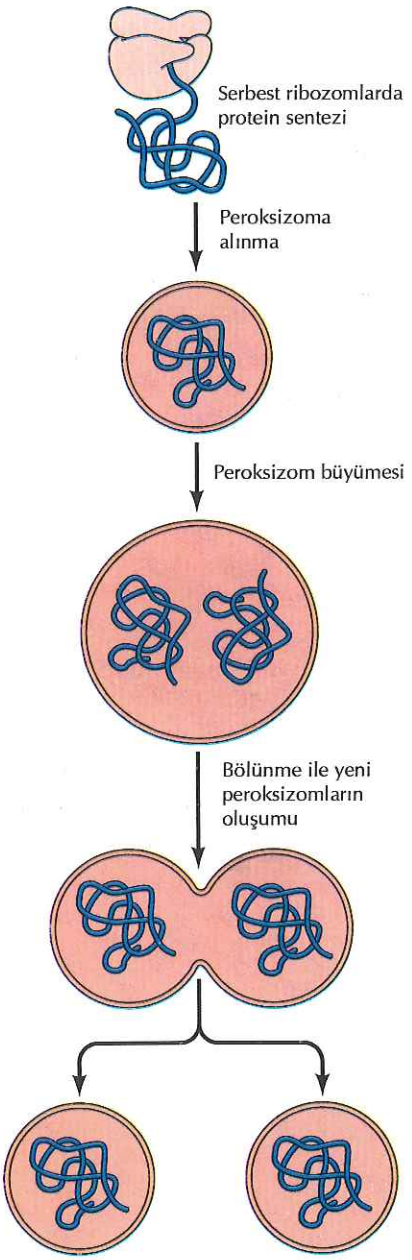


Şekil 10.28 Fotosolunumda peroksizomların rolü
Fotosentez sırasında Calvin döngüsü ile, CO_2 karbohidratlara dönüştürülür ve bu döngü CO_2'in beş karbonlu bir şeker olan ribuloz 1,5- bisfosfata eklenmesiyle başlar. Ancak bazen ilgili enzim CO_2 yerine O_2 eklenmesini katalizler ve bunun sonucunda iki karbonlu bir bileşik olan fosfoglikolat üretilir. Glikolata dönüşen fosfoglikolat daha sonra peroksizomlara iletilir ve burada oksitlenerek glisine dönüştürülür. Mitokondriye taşınan glisin serine dönüştürülür. Serin tekrar peroksizomlara döner ve tekrar kloroplasta gönderilmek üzere gliserata dönüştürülür.

gliserat kloroplasta geri döner ve Calvin döngüsüne katılır. Aslında fotosentezin karşıtı olup, hiç ATP üretmeden O_2 kullanıp CO_2 oluşturduğundan, fotosolunumun bitkiye bir yararı yoktur. Ancak, arada sırada CO_2 yerine O_2 kullanımı rubisco'nun doğal özelliği olduğundan fotosolunum genellikle fotosenteze eşlik eder. Bu nedenle peroksizomlar, glikolat yapısındaki karbonların çoğunun geri kazanılmasını ve kullanılmasını sağlayarak önemli bir rol oynarlar.

Peroksizom Yapılanması

Daha önce belirtildiği gibi, peroksizomların yapılanması, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve lizozomdan çok mitokondri ve kloroplastlarınkine benzer. Peroksizoma gidecek proteinlerin hemen, hemen tamamı sitoplazmadaki serbest ribozomlarda sentezlenir ve peroksizom içine tamamlanmış polipeptid zincirleri olarak taşınır (Şekil 10.29). Fosfolipidler de peroksizomlara, ER'deki en önemli sentez bölgesinden, fosfolipid transfer proteinleri aracılığıyla alınır. Proteinlerin ve fosfolipidlerin alınması peroksizom büyümesine neden olur ve daha sonra eskilerin bölünmesiyle yeni peroksizomlar oluşur.



Şekil 10.29 Peroksizomların yapılanması
Peroksizomlara gidecek olan proteinler serbest ribozomda sentezlenirler ve mevcut peroksizomlara tamamlanmış polipeptid zincirleri şeklinde alınırlar. Protein alımı peroksizomların büyümesine ve eskilerin bölünmesiyle yeni peroksizomların oluşmasına neden olur.

Proteinlerin peroksizomların içine hedeflenmesi, mayadan insana kadar korunmuş olan en az iki yolakla gerçekleşir. Çoğu protein peroksizomlara, karboksi ucundaki basit Ser-Lys-Leu dizisiyle (peroksizoma hedefleyen sinyal 1 ya da PTS1) hedeflenirler. Daha az sayıda protein amino uçlarındaki dokuz amino asitlik diziyle (PTS2) hedeflenirler.

PTS1 ve PTS2, sitozolde bulunan özel reseptör ya da taşıyıcı protein seti tarafından tanınırlar ve peroksizom zarından geçişlerine aracılık yapacak bir komplekse aktarılırlar. Polipeptid zincirlerinin, endoplazmik retikulum, mitokondri ve kloroplast zarlarından aktarılmasından farklı olarak, proteinlerin peroksizomlara alınması sırasında hedefleyici sinyaller genellikle kesilmez. Sitozolde bulunan Hsp70, proteinlerin peroksizomlara alınışıyla ilişkilendirilmiştir, fakat peroksizom içerisindeki şaperonların rolü (leri) açık değildir. Peroksizom proteinlerinin katlanması sitozolde, reseptörlerle bağlıyken gerçekleşir ve proteinler peroksizoma uzun polipeptid zincirleri tarzında değil, kısmen katlanmış olarak katılırlar.

Peroksizomlar, sitozolden, farklı zamanlarda farklı protein türlerinin alınmasını gerektiren karmaşık bir olgunlaşma süreci geçirirler. Lümene ait enzimlerin hedeflenmesi için gerekli peroksizom zarı reseptörleri ilk olarak alınmalıdır. Bu reseptörlerin, peroksizom öncülü bir lipid vezikülü içinde ER den tomurcuklandığına dair kanıt vardır. Ayrıca, son çalışmalar, peroksizomun olgunlaşmasıyla enzim içeriğinin ve dolayısıyla metabolik aktivitelerinin değiştiğini göstermektedir.

İlginç şekilde, peroksizomlara dışardan molekül alım yolaklarının bazı bileşenleri sadece maya mutantları olarak değil, aynı zamanda peroksizom bozuklukları görülen ciddi insan hastalıklarıyla ilişkili mutasyonlar olarak da karşımıza çıkmaktadır. Bu şekildeki bazı hastalıklarda yalnızca tek bir peroksizom enzimi yetersizdir. Halbuki, peroksizom işlev hatalarına bağlı diğer bazı hastalıklarda çok sayıda peroksizom enziminin içeri alınması gerçekleşmez ve sitozolde kalırlar. İkinci gruptaki hastalıklar, peroksizoma protein alımından sorumlu olan PTS1 ve PTS2 yolaklarının yetersizliğinden kaynaklanır. Prototip örnek, yaşamın ilk on yılı içerisinde ölümle sonlanan Zellweger sendromudur. Zellweger sendromu, peroksizoma protein alımını etkileyen en az on farklı gendeki mutasyonların sonucu olarak görülebilir, bu genlerden biri, peroksizoma hedefleme sinyali PTS1'i tanıyan reseptörü kodlayan gen olarak belirlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

mitokondri, krista, matriks, porin

ÖZET

MİTOKONDRİLER

Mitokondri Yapısı ve Organizasyonu: Metabolik enerji elde edilmesinde önemli rol oynayan mitokondriler bir çift zar sistemiyle çevridirler. Matriks, sitrik asit döngüsü enzimlerini içerir; iç zar elektron taşınması ve oksidatif

fosforilasyonda görevli protein kompleksleri taşır. İç zarın aksine dış zar küçük moleküllerin serbest geçişine izin verir.

Mitokondrinin Genetik Sistemi: Mitokondriler, rRNA ları, tRNA ları ve oksidatif fosforilasyonla ilgili bazı proteinleri kodlayan, kendi genomlarına sahiptirler.

endosimbiyoz

Protein Alımı ve Mitokondri Yapılanması: Mitokondri proteinlerinin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır. Bu proteinler serbest ribozomlar üzerinde sentezlenir ve mitokondri içine tamamlanmış polipeptid zincirleri halinde alınırlar. Pozitif yüklü öncül diziler proteinleri, mitokondri matriksine alınmak üzere hedeflerler. Fosfolipidler endoplazmik retikulumdan mitokondrilere, fosfolipid transfer proteinleri aracılığıyla taşınırlar.

öncül dizi, Tom kompleksi, Tim kompleksi, matriks işlemci peptidazı (MPP), fosfolipid transfer proteinleri, kardiyolipin

OKSİDATİF FOSFORİLASYON MEKANİZMASI

Elektron Taşıma Zinciri: Oksidatif metabolizmadan elde edilen enerjinin büyük bölümü elektronların NADH ve $FADH_2$'den O_2'ye taşınmasından sağlanır. Bu enerjiyi kullanılabilir formda toplamak için elektronlar, mitokondri iç zarında dört protein komplekste yer alan bir dizi taşıyıcıdan geçirilir.

oksidatif fosforilasyon, elektron taşıma zinciri, koenzim Q, ubikinon, sitokrom c, sitokrom oksidaz

Kemiozmotik Eşlenme: Elektron taşınımının enerji üreten reaksiyonları, mitokondri iç zarının iki yanında bir proton gradienti oluşmasıyla eşlenir. Bu gradientte depolanan potansiyel enerji, protonların matrikse enerjetik olarak desteklenen geri dönüşünü ATP sentezine eşleyen beşinci bir kompleks, ATP sentaz, tarafından toplanır.

kemiozmotik eşlenme, elektrokimyasal gradient, ATP sentaz

Metabolitlerin İç Zardan Taşınması: ATP sentezine ek olarak, proton gradientinde saklı potansiyel enerji ATP, ADP ve diğer metabolitlerin mitokondri içine ve dışına taşınmasını da sağlar.

KLOROPLASTLAR VE DİĞER PLASTİDLER

Kloroplastların Yapısı ve İşlevi: Kloroplastlar fotosentezde ve diğer çeşitli metabolik aktivitelerde iş gören büyük organellerdir. Mitokondriler gibi, kloroplastlar da çift zardan oluşan bir zarfla çevrilidir. Kloroplastlar ayrıca iç kısımda, elektron taşınmasının ve kemiozmotik ATP üretiminin gerçekleştiği bölge olarak tilakoid zarlara sahiptirler.

kloroplast, tilakoid zar, stroma

Kloroplast Genomu: Kloroplast genomu rRNA'lar, tRNA'lar, bazı ribozomal proteinler ve fotosentezde görevli bazı proteinleri kodlayan genleri kapsayan 100'den fazla gen içerir.

Kloroplast Proteinlerinin İçeri Alınması ve Dağıtımı: Kloroplast proteinlerinin çoğu sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenir ve amino-ucu transit peptidleri aracılığıyla kloroplast içerisine alınmak üzere hedeflenir. Tilakoid lümene alınacak olan proteinler önce kloroplast stromasına alınır ve daha sonra ikinci bir sinyal dizi aracılığıyla tilakoid zardan taşınmaya hedeflenir.

transit peptidi, yönlendirme kompleksi, Toc kompleksi, Tic kompleksi, stroma işlemci peptidazı (SPP)

plastid, kromoplast, lökoplast, amiloplast, elayoplast, proplastid, etyoplast

Diğer Plastidler: Kloroplast, aynı genoma sahip benzer organeller ailesinin sadece bir üyesidir. Diğer plastidler nişasta ya da lipidler gibi enerji kaynaklarını depolarlar ve bitki metabolizmasının diğer alanlarında işlev görürler.

FOTOSENTEZ

klorofil, fotomerkez, fotosistem I, fotosistem II, sitokrom *bf* kompleksi, NADP redüktaz

Elektronların Fotosistem I ve II'den Akışı: Fotosentez sırasında güneş ışınının enerjisi elde edilir ve kullanılabilir formda potansiyel kimyasal enerjiye dönüştürülür. Klorofiller tarafından ışığın soğurulması elektronları daha yüksek enerji düzeyine çıkartır. Daha sonra bu yüksek enerjili elektronlar, tilakoid zarda iki fotosistemde ve sitokrom bf kompleksinde organize olan bir dizi taşıyıcıdan geçirilir. Elektronların ardışık olarak iki fotosistemden akışı, fotosistem II'de ATP senteziyle, fotosistem I'de $NADP^+$'nin NADPH'a indirgenmesiyle eşlenir. ATP ve NADPH daha sonra, kloroplast stromasında CO_2'den karbohidratların sentezlenmesinde kullanılır.

döngüsel elektron akışı

Döngüsel Elektron Akışı: Döngüsel elektron akışı alternatif yolağı, ışık enerjisinin fotosistem I'de tutulmasını ve NADPH yerine ATP'ye dönüştürülmesini sağlar.

ATP Sentezi: Kemiozmotik ATP sentezi, tilakoid zarın iki yanındaki proton gradientiyle sağlanır.

PEROKSİZOMLAR

peroksizom, katalaz, plazmalojen, glioksalat döngüsü, glioksizom, fotosolunum

Peroksizomların İşlevleri: Peroksizomlar, tek zarla çevrili, yağ asidi oksidasyonu, glioksalat döngüsü ve fotosolunum gibi çeşitli metabolik reaksiyonlarda görevli enzimleri içeren küçük organellerdir.

Peroksizom Yapılanması: Peroksizom proteinleri sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenerek peroksizomların içerisine tamamlanmış polipeptid zincirleri şeklinde alınırlar. En az iki tip sinyal, proteinleri peroksizomun içine hedefler, ancak, protein alım mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

Sorular

1. Mitokondri iç zarının olağan dışı yüksek metabolik aktivitesi hangi iki özelliğine bağlıdır?

2. Standart "wobble" kuralına göre, sitozoldeki protein sentezi en az 30 farklı tRNA gerektirir. İnsan mitokondrisi, mRNA'ları sadece 22 tRNA ile okumayı nasıl başarır?

3. İç mitokondri zarının iki yanındaki elektrik potansiyelinin kaybolduğunu ve elektrokimyasal gradientin yalnızca, bir pH birimlik bir proton konsatrasyon gradientinden ibaret olduğunu farz edin. Bu gradientte depolanan serbest enerjiyi hesaplayın. Hesaplamanızda $R = 1.98 \times 10^{-3}$ kcal/mol/deg, T= 298K (25°C) kullanın ve $\ln(x) = 2.3 \log_{10}(x)$ olduğuna dikkat edin.

4. Mitokondriye protein alımı sırasında moleküler şaperonların rolü nedir?

5. Sitokrom b_2 sitoplazmada sentezlenir ve olağan pozitif-yüklü mitokondri öncül dizisinin arkasında ikinci bir hidrofobik sinyal dizisine sahiptir. Mitokondri zarlar arası bölgesindeki son yerine ulaştıracak bir yolak önerin.

6. Koenzim Q ve sitokrom *c*'nin elektron taşıma sistemindeki görevleri nedir?

7. ATP sentaz iki, çok alt birimli kompleksden, F_0 ve F_1 den oluşur. Her birinin mitokondri ve kloroplastta nerede yerleştiğini ve her birinin işlevini açıklayınız.

8. Mitokondri proteinlerinin öncül dizilerinin aksine, kloroplast proteinlerinin transit peptidlerinin, pozitif yüklü olması neden gerekli değildir?

9. Fotosentezde, altı molekül O_2 yapımıyla sonlanan bir molekül glukoz üretimi için kaç yüksek-enerjili elektron gerekir? Bu elektronların fotosistem I ve II'den geçişi sonucunda kaç molekül ATP ve NADPH oluşturulur?

10. Fotosolunumla glikolata dönüştürülen karbon atomlarının ne kadarı peroksizomlar tarafından kurtarılır?

11. Proteinler peroksizomlara nasıl hedeflenir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Mitokondriler

Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Aismark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A.-S. Eriksson, H. H. VVinkler and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133-140. [P]

Clayton, D. A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:453-478. [R]

Dietrich, A., J. H. Weil and L. Marechal-Drouard. 1992. Nudear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:115-131. [R]

Gabriel, K., S. K. Buchanan and T. Lithgow. 2001. The aipha and the beta: Protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. Trends Biochem. Sci. 26:36-40. [R]

Gray, M. W., G. Burger and B. F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. Science 283: 1476-1481. [R]

Jensen, R. E. and C. D. Dunn. 2002. Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: Role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 25-34. [R]

Lang, B. R, G. Burger, C. J. 0'Kelly, R. Cedergren, G. B. Golding, C. Lemieux, D. Sankoff, M. Turmel and M. W. Gray 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387: 493-497. [P]

Luft, R. 1994. The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8731-8738. [R]

Michel, H. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 95:12819-12824. [P]

Michikawa, Y., R Mazzucchelli, N. Bresolin, G. Scarlato and G. Attardi. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286: 774-779. [P1

Neupert, W. and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:555-565. [R]

Peeters, N. and I. Small. 2001. Dual targeting to mitochondria and chioroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 54-63. [R]

Pfanner, N. and A. Chacinska. 2002. The mitochondrial import machinery: Preprotein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1592:15-24. [R]

Pfanner, N. and A. Geissler. 2001. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 339-349. [R]

Pfanner, N. and N. Wiedemann. 2002. Mitochondrial protein import: Two membranes, three translocases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 400-411. [R]

Rapaport, D. 2002. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem. Sci.* 27:191-197. [R]

Shadel, G. S. and D. A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNAmaintenance in vertebrates. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 409-435. [R]

Stuart, R. 2002. insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: The role of the Oxal complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1592:79-87. [R]

Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in manandmouse. *Science* 283:1482-1488. [R]

Oksidatif Fosforilasyon Mekanizması

Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and Oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069. [R]

Mitcheli, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206:1148-1159. [R]

Nicholis, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. London: Academic Press.

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitcheli: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39:210-215. [R]

Rastogi, V. and M. E. Girvin. 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402: 263-268. [P]

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the *fin de siecle. Science* 283:1488-1493. [R]

Tielens, A. G., C. Rotte, J. J. Van Hellemond and W. Martin 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27: 564-572. [R]

Yoshida İV1., E. Muneyuki and T. Hisabori. 2001. ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 669-677. [R]

Kloroplastlar ve Diğer Plastidler

Chen, X. and D. J. Schnell. 1999. Protein import into chioroplasts. *Trends Cell Biol.* 9: 222-227. [R]

Douce, R. and J. Joyard. 1990. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:173-216. [R]

Ellis, R. J. 1990. Molecular chaperones: The plant cormection. *Science* 250:954-959. [R]

Gruissem, W. 1989. Chioroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* 56:161-170. [R]

Jackson-Constan, D., M. Akita and K. Keegstra. 2001. Molecular chaperones involved in chioroplast protein import. Biochim. *Biophys. Acta* 1541:102-113. [R]

Jarvis, P. and J. Soll. 2002. Toc, Tic, and chioroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1590:177-189. [R]

Rochaix, J. -D. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chioroplast genes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 1-28. [R]

Subramanian, A. R. 1993. Molecular genetics of chioroplast ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18:177-180. [R]

Sugiura, M. 1992. The chioroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149-168. [R]

van Dooren, G. G., S. D. Schwartzbach, T. Osafune and G. I. McFadden. 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 1541:34-53. [R]

Fotosentez

Arnon, D. 1.1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9:258-262. [R]

Barber, J. and B. Andersson. 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370:31-34. [R]

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268-271. [R]

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis*. *Nature* 318: 618-624. [P]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:1-23. [R]

Kuhibrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex bv electı-on crystallography. *Nature* 367:614-621. [P]

Nicholis, D. G. and S. J. Ferguson. 2002. *Bioenergetics*, 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press.

Rhee, K.-H., E. P. Morris, J. Barber and W. Kıihibrandt. 1998. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 A resolution. Nature 396: 283-286. [P]

Rogner, M., E. J. Boekema and J. Barber. 1996. How does photosystem 2 spiit water? The structural basis of efficient energy conversion. Trends Biochem. Sci. 21: 44-49. [R]

Youvan, D. C. and B. L. Marrs. 1987. Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256(6): 42-48. [R]

Peroksizomlar

Gould, S. J. and C. S. Collins, 2002. Peroxisomal-protein import: Is it realiy that complex? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:382-389. [R]

Tabak, H. F., I. Braakman and B. Distel. 1999. Peroxisomes: Simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol.* 9: 447-453. [R]

Titorenko, V. I. and R. A. Rachubinski. 2001. The life cyde of the peroxisome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:357-368. [R]

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50:133-157. [R]

Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197. [R]

Ertan ALTAYLI
Yrd.Doç.Tbp.Alb.(1995-35)
GATA Tıbbi Biyoloji A.D. Bşk.lığı
Dip./Dok.Tes.Nu.:75341/TBG.174

Bölüm 11 Hücre İskeleti ve Hücre Hareketi

Aktin Filamanlarının Yapısı ve Organizasyonu 435

Aktin, Miyozin ve Hücre Hareketi 447

Ara Filamanlar 455

Mikrotübüller 462

Mikrotübül Motorları ve Hareketleri 468

ANAHTAR DENEY: Mutant Keratin Ekspresyonu Anormal Deri Gelişimine Neden Olur 460

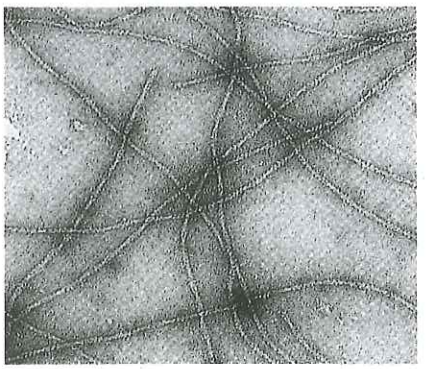
ANAHTAR DENEY: Kinezin İzolasyonu 470

ÖNCEKİ BÖLÜMLERDE İNCELENEN zarla çevrili organeller; ökaryot hücrelerin alt yapı organizasyonunda bir düzeyi simgeler. Tüm ökaryot hücrelerde sitoplazmaya doğru yayılan protein filamanları ağından oluşan hücre iskeleti ile daha ileri düzeyde bir organizasyon sağlanır. Hücre iskeleti hücre için yapısal bir çerçeve sağlar, hücre şeklini ve sitoplazmanın organizasyonunu belirleyen bir yapı iskelesi görevi yapar. Bu yapısal görevlerine ek olarak, hücre iskeleti hücre hareketlerinin gerçekleşmesinden sorumludur. Hücre hareketleri, yanlızca hücrelerin bütünsel hareketlerini değil, aynı zamanda organellerin ve diğer bazı yapıların (mitotik kromozom gibi) sitoplazma boyunca hücre içinde taşınmasını da içerir. Hücre iskeleti, adının çağrıştırdığı kadar sert ve değişmez bir yapı değildir. Bunun yerine, örneğin hücre bölünmesi sırasında hücrelerin hareket etmesi ve şekil değiştirmesi için sürekli yeniden düzenlenen dinamik bir yapıdır.

Hücre iskeleti üç temel protein filaman tipinden oluşmuştur: aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller. Bunlar bir arada bulunurlar ve çok sayıda aksesuar protein aracılığı ile hücre içi organeller ve plazma zarı ile bağlantılıdırlar. Bu bölümde hücre iskeletinin bu üç ana elemanının her birinin yapı ve organizasyonu, aynı zamanda hücre hareketi, organel taşınması, hücre bölünmesi ve diğer hücre hareketi tiplerindeki rolleri incelenecektir.

Aktin Filamanlarının Yapısı ve Organizasyonu

Çoğu hücre için ana hücre iskeleti proteini **aktin**dir, aktin proteini aktin filamanlarına polimerleşir bu ince, esnek lifler yaklaşık 7 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğundadır (Şekil 11.1). Hücre içinde aktin filamanları (aynı zamanda **mikrofilamanlar** olarak da adlandırılır) yarı katı jel özelliğinde paketler, ya da üç-boyutlu ağ yapısı oluşturacak, çok iyi-düzenlenmiş bir yapı halinde organize olur. Aktin filamanlarının bir araya gelmesi ve ayrılması, paketler ve birbirleri ile ağ oluşturacak şeklide çapraz bağlantılar yapmaları ve diğer hücresel yapılar (plazma zarı gibi) ile etkileşimleri çok sayıda aktin-bağlayan protein ile düzenlenir. Bu proteinler, aktin hücre iskeletinin önemli elemanlarındandır. Aktin filamanları özellikle



50 nm

Şekil 11.1 Aktin filamanları
Aktin filamanlarına ait elektron mikrograf (Roger Craig'in izniyle, University of Massachusetts Medical Center)

plazma zarının hemen altında; mekanik destek sağlayacak, hücre şeklini belirleyecek ve hücrelerin yüzey hareketlerinin gerçekleştirmesine böylece hücrelerin göç etmesi, partikül alması ve bölünmesine olanak sağlayacak bir ağ oluşturur.

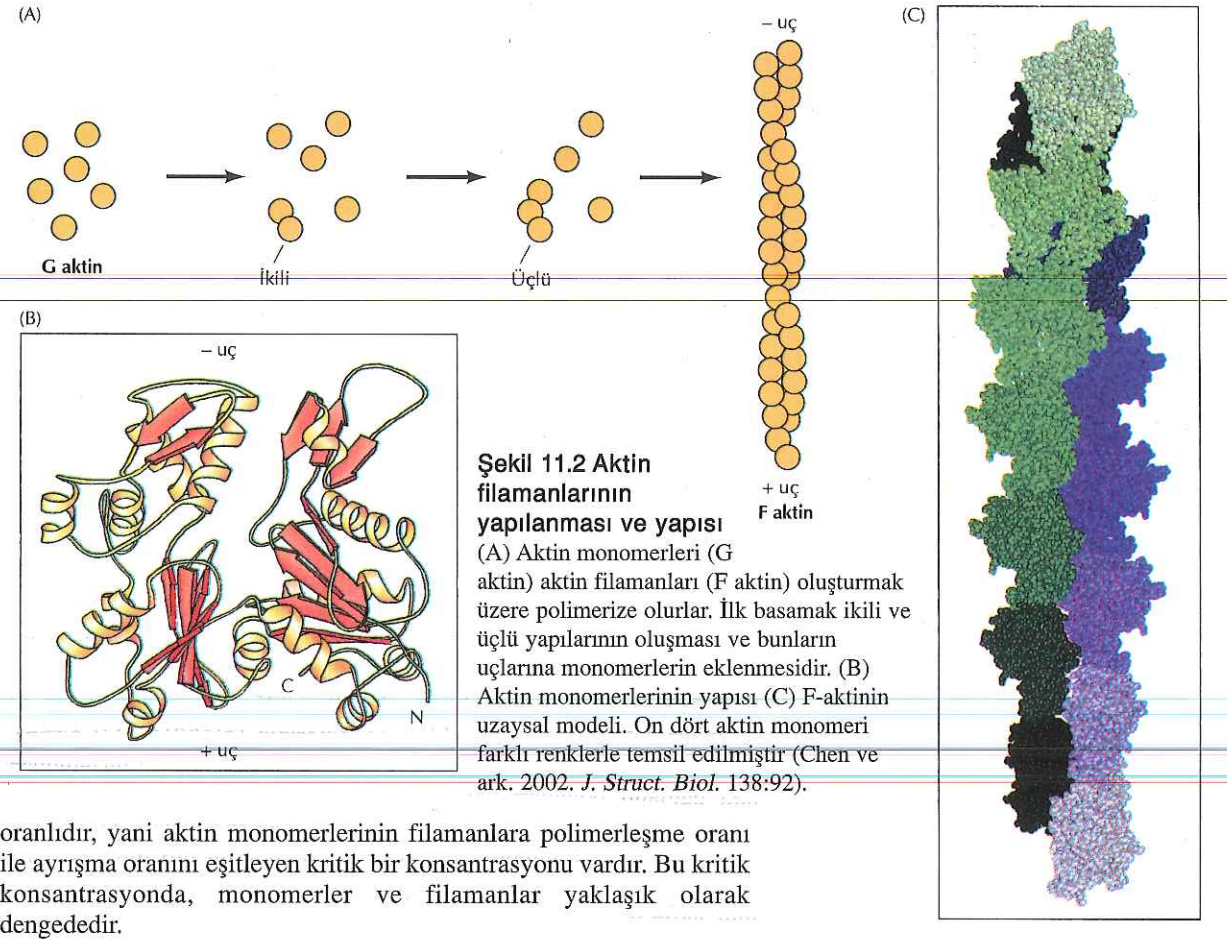
Aktin Filamanların Yapılanması ve Ayrışması

Aktin ilk olarak 1942 yılında, toplam hücre proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturduğu kas hücrelerinden izole edilmiştir. Başlangıçta aktinin yalnızca kas kasılması ile ilişkili olduğu düşünülse de, günümüzde tüm ökaryot hücrelerinde en fazla miktarda bulunan protein (toplam proteinin %5-10'u) olduğu bilinmektedir. Mayalarda yalnızca bir aktin geni vardır, fakat yüksek ökaryotlarda aktin gen ailesinin farklı üyelerini kodlayan birçok farklı tipte aktin geni bulunur. Örneğin, memelilerde en az altı farklı aktin geni vardır: bunlardan dördü farklı kas tiplerinde eksprese edilirken, ikisi kas dışındaki hücrelerde eksprese olur. Bununla birlikte aktinlerin tümünün amino asid dizilimleri birbirine benzerdir ve ökaryotlarda evrim süresince korunmuştur. Örneğin, maya aktini ile, memeli hücrelerindeki aktinlerin amino asid dizilimleri %90 oranında aynıdır. Kısa bir süre önce, bakterilere çubuk şeklini veren bir protein olan MreB'nin, prokaryotlarda aktinlerin atası olduğu tanımlanmıştır.

Hem aktin moleküllerinin, hem de aktin filamanlarının üç boyutlu yapısı 1990'da Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Aktin molekülleri 375 amino asildlik (43 kd) globüler proteinlerdir. Her aktin monomerinin (**globüler [G] aktin**), iki aktin monomeri arasındaki baş-kuyruk etkileşimlerini düzenleyen sıkı bağlantı bölgeleri vardır, böylece aktin monomerleri filamalar şeklinde polimerize olur (**filamentöz [F] aktin**) (Şekil 11.2). Her monomer filaman içinde 166° döner, bu şekilde bir çift-iplikli sarmal görünümü oluşur. Bütün aktin monomerleri aynı yönde eklendikleri için, aktin filamanlarının iki ucunun yükleri farklıdır ve uçların (artı ve eksi uçlar olarak adlandırılır) birbirinden farkı ayırt edilebilir. Aktin filamanlarının bu polaritesi; hem yapılanmaları, hem de bu bölümde daha sonra da anlatılacağı gibi, miyozin hareketinin aktine göre tek bir yönde gerçekleşmesi için önemlidir.

Aktin filamanlarının yapılanması, *in vitro* koşullarda aktin solüsyonunun iyonik gücünün düzenlenmesi ile çalışılabilir. Düşük iyonik güçteki solüsyonlarda, aktin filamanları monomerlerine ayrışır. Eğer iyonik güç fizyolojik olarak artırılırsa, aktin kendiliğinden polimerize olur. Aktin polimerleşmesinin ilk basamağı (nükleasyon olarak adlandırılır) üç aktin monomeri içeren küçük bir birikim oluşumudur. Böylece monomerlerin her iki uçtan ters olarak eklenmesi ile aktin filamanları büyüyebilir, ancak uçlardan birisi (artı uç) eksi uca göre beş ila on kez daha hızlı uzar. Aktin monomerleri aynı zamanda ATP'ye de bağlanır, ATP filaman yapılanmasını takiben ADP'ye hidrolize olur. Polimerleşme için ATP gerekmemesine karşın, ATP bağlı aktin monomerleri ADP bağlı olanlara göre daha çabuk polimerleşir. Daha sonra da anlatılacağı gibi, ATP bağlanması ve hidrolizi, aktin filamanlarının yapılanmasının düzenlenmesinde ve dinamik davranışlarında önemli bir rol oynar.

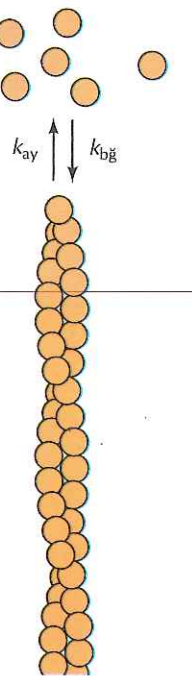
Aktin polimerleşmesi geri dönüşümlü olduğu için, filamanlar aktin alt birimlerinin ayrılması ile depolimerize olabilir, böylece gerektiği zaman aktin filamanlarının yıkımı sağlanır (Şekil 11.3). Bundan dolayı, aktin monomerleri ve filamanları arasındaki denge korunur, bu da serbest monomerlerin konsantrasyonuna bağımlıdır. Aktin monomerlerinin filaman yapısına katılma hızı konsantrasyonlarıyla



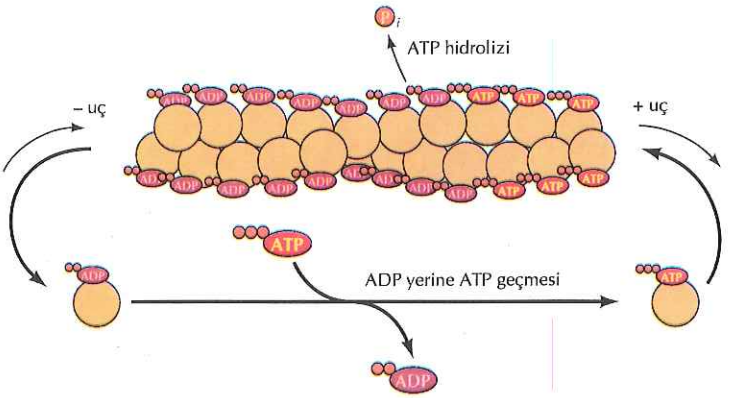
Şekil 11.2 Aktin filamanlarının yapılanması ve yapısı
(A) Aktin monomerleri (G aktin) aktin filamanları (F aktin) oluşturmak üzere polimerize olurlar. İlk basamak ikili ve üçlü yapılarının oluşması ve bunların uçlarına monomerlerin eklenmesidir. (B) Aktin monomerlerinin yapısı (C) F-aktinin uzaysal modeli. On dört aktin monomeri farklı renklerle temsil edilmiştir (Chen ve ark. 2002. *J. Struct. Biol.* 138:92).

oranlıdır, yani aktin monomerlerinin filamanlara polimerleşme oranı ile ayrışma oranını eşitleyen kritik bir konsantrasyonu vardır. Bu kritik konsantrasyonda, monomerler ve filamanlar yaklaşık olarak dengededir.

Daha önce de söylendiği gibi, aktin filamanlarının iki ucu farklı oranlarda büyür, monomerlerin hızlı büyüyen uca (pozitif uç) eklenmesi, yavaş büyüyen (negatif) uca eklenmesine göre beş ila on kat daha hızlıdır. Çünkü ATP-aktin ADP-aktine göre daha az ayrışır, bu her iki uçta polimerizasyon için gerekli olan monomerlerin kritik konsantrasyonlarının farklı olmasına neden olur. Bu fark, **yürüme (treadmilling)** olarak bilinen bir fenomen ile sonuçlanır, bu da aktin filamanlarının dinamik doğasını gösterir (Şekil 11.4). Sistem durgunluk döneminde iken, serbest aktin monomeri konsantrasyonu, aktin filamanlarının artı ve eksi uçlarının polimerleşmesi için gerekli kritik konsantrasyonların arasında olmalıdır. Bu koşullar altında, eksi uçtaki monomerlerin net kaybı söz konusudur, bu artı uca net eklenme ile dengelenir. Yürüme için ATP gereklidir, ATP-aktin filamanın artı ucuna eklenirken, ADP-aktin eksi uçtan ayrışır. Yürümenin hücredeki rolü tam olarak bilinmemektedir, hücrelerin hareket etmesi ve şekil değiştirmesi için aktin filamanlarının dinamik yapılanma ve yıkılmasını gösteriyor olabilir.



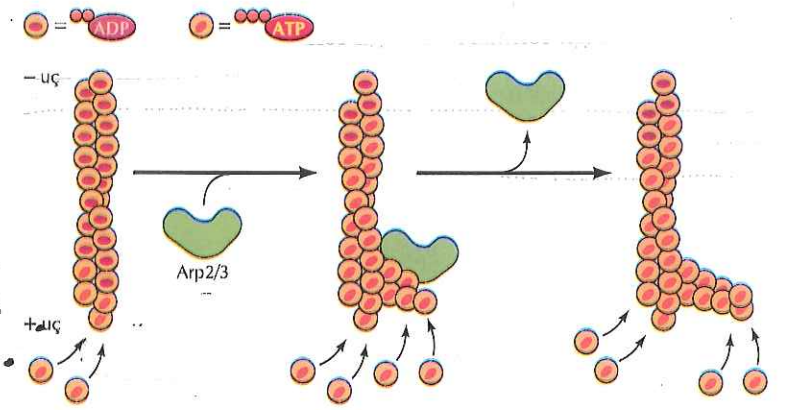
Şekil 11.3 Aktin monomerlerinin geri dönüşümlü polimerleşmesi
Aktin polimerleşmesi monomerlerin aktin filamanlarının uçlarına bağlanıp ayrıştığı, geri dönüşebilir bir olaydır. Alt birim ayrışması hızı (k_{ay}) monomer yoğunluğundan bağımsızdır. Altbirim bağlanma hızı ise serbest monomerlerin yoğunluğu ile orantılıdır ve C X $k_{bğ}$ (C=serbest monomerlerin konsantrasyonu) formülü ile tanımlanır. Monomerlerin kritik konsantrasyonunda (C_c) dengeye ulaşılır ve $k_{ay} = C_c$ X $k_{bğ}$ ile gösterilir.



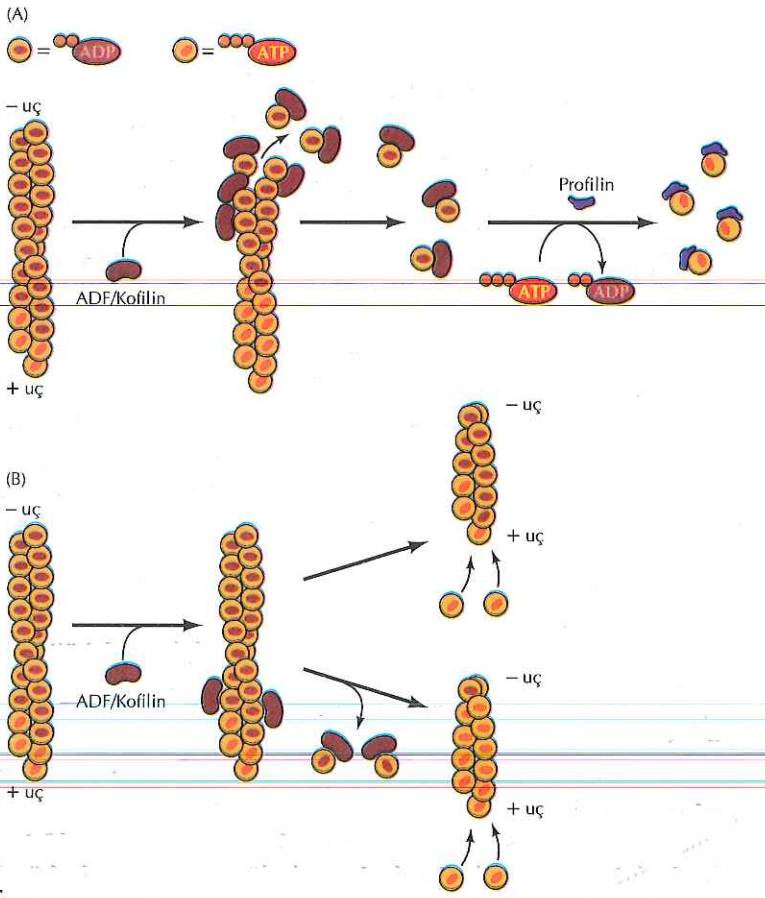
Şekil 11.4 Yürüme
Aktin filamanlarında eksi uç, artı uca göre daha az hızlı büyür. Büyüme hızındaki bu fark filamanların iki ucuna monomerlerin eklenmesi için kritik konsantrasyonda fark olarak yansır. ATP'ye bağlı durumdaki aktin hızla büyümekte olan artı ucuna bağlanır ve aktine bağlı ATP, ADP'ye hidrolize olur. ADP-aktin, ATP-aktine göre filamanlardan daha kolay ayrıştığından, aktin monomerlerinin, kritik konsantrasyonu, eksi uca eklenme bakımından artı uca göre daha yüksektir. Yürüme, monomer yoğunluğu ile, artı ve eksi uçlar için kritik konsantrasyon arasındaki denge ile meydana gelir. Bu koşullar altında ADP'ye bağlı formdaki monomerlerin eksi uçtan net ayrışması gerçekleştir ve bu durum ATP'ye bağlı formdaki monomerlerin artı uca eklenmesi ile dengelenir.

Hücre biyolojisinde yararlanılan birçok ilacın da aktine bağlanarak, aktin polimerleşmesini değiştirerek etki yapması dikkate değerdir. Örneğin, **sitokalasinler** aktin filamanlarının artı ucuna bağlanırlar ve uzamalarını durdururlar. Bu, hücre şeklinin değişmesi kadar, bazı hücre tiplerinde hücre hareketlerinin (örn., mitozu izleyen hücre bölünmesi) engellenmesi ile sonuçlanır ve bu işlevler için aktin filamanlarının gerekli olduğunu gösterir. Bir diğer ilaç olan **falloidin,** aktin filamanlarına sıkıca bağlanarak, tek tek aktin moleküllerine ayrışmasını önler. Floresan mikroskop ile aktin filamanlarının görüntülenmesinde sıklıkla floresan bir boya ile işaretlenmiş falloidin kullanılır.

Hücre içinde, **aktine-bağlanan proteinler** aktin filamanlarının hem yapılanmasını, hem de ayrışmasını düzenler. Aktin filamanlarının geri dönüşümü hücre içinde, *in vitro* koşullardakinden yaklaşık 100 kez daha hızlıdır ve aktinin bu hızlı geri dönüşümü birçok hücre hareketinde kritik rol oynar. Örneğin, göç eden hücrelerin öncü ucunda yoğun olarak paketlenmiş aktin filamanları saniyeler içinde oluşabilir. Bu sürecin anlaşılmasında anahtar, Tom Pollard ve arkadaşları tarafından 1994'de mikrofilamanların artı uçlarındaki aktin/ATP'ye bağlanan **Arp2/3 kompleksi**nin keşfidir (Şekil 11.5). Arp2/3 kompleksi, yedi proteinden oluşur, bu komplekstek proteinlerden ikisi aktine benzer. Kompleksin kendi aktivitesi çok düşüktür, ancak birçok protein bu komplekse bağlanır ve aktive eder. Arp 2/3 kompleksi aktive olduğu zaman, mevcut aktin filamanının artı ucuna yakın bir bölgeye bağlanır ve yeni dallar oluşturur.



Şekil 11.5 Aktin filaman dallanmasının başlaması
Arp2/3 kompleksi artı uçlarının yakınından aktin filamanlarına bağlanır ve dallanma yapılarının oluşumunu başlatır.



Şekil 11.6 ADF/kofilin ve profilinin aktin filamanları üzerine etkileri
ADF/kofilin iki farklı aktiviteye sahiptir. (A) Aktin filamanlarına bağlanan ve eksi uçtan aktin monomerlerinin ayrışma hızını arttıran aktin depolimerizasyon faktörüdür. ADF/kofilin, aktin/ADP monomerlerine bağlı kalarak yeniden filamanlara eklenmesini engeller. Profilin, bağlı ADP'nin ATP'ye dönüşümünü uyarabilir. Bu da, yeniden filamanlara polimerleşerek aktin/ATP monomerlerinin oluşumu ile sonuçlanır. (B) ADF/kofilin ayrıca aktin filamanlarına bağlanıp, ayrışmalarına da yol açabilir. Bu da yeni artı uçların oluşmasına yol açar.

Hücre içinde aktin filamanlarının yeniden düzenlenmesinden sorumlu ikinci protein ailesi **ADF/kofilin** (aktin *d*epolimerize edici faktör) ailesidir (Şekil 11.6). Bu proteinler aktin filamanlarına bağlanır ve eksi uçtan aktin/ADP monomerlerinin ayrışma oranını artırır. ADF/kofilin aynı zamanda aktin filamanlarını ikiye keserek daha fazla artı uç oluşmasını sağlar ve filaman yapılanmasını artırır. ADF/Kofilin ADP-aktine bağlanmayı tercih eder, böylece filaman ayrışması sonrasında aktin monomerlerine bağlı kalır ve onları ADP-bağlı formda tutarak, filamana yeniden bağlanmasını engeller. Ancak, bir diğer aktin-bağlayan protein olan **profilin**, kofilinin bu etkisini geri dönüştürür ve aktin monomerlerinin filamana bağlanmasını uyarır. Profilin, ADP bağlı formun ATP bağlı form ile değişmesini uyararak etki gösterir, aktin/ATP monomerlerinin oluşması sonucunda, aktin kofilinden ayrılır ve filamanın yapılanmasına katılmaya hazır hale geçer.

Tahmin edileceği gibi, kofilin, profilin ve Arp 2/3 kompleksinin aktivitesi, birçok sinyal ileti mekanizması ile kontrol edilir (Bölüm 13'de anlatıldı), böylece çevresel uyarılara yanıt olarak, aktin polimerleşmesinin düzenlenmesini sağlanır. Böylece ADF/kofilin, profilin ve Arp 2/3 kompleksi (ve diğer aktin-bağlayan proteinler), aktin filamanlarının hızlı dönüşümünde ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, birlikte etkili olurlar. Bu da, çok çeşitli

hücre hareketlerinin ve hücre şekil değişikliklerinin gerçekleşmesi için gereklidir. Mikrofilaman yapılanması ve ayrışması, bazı hücre tiplerinde hücredeki ATP hidrolizleri ve dönüşümlerinin yarısından sorumlu çok önemli bir süreçtir.

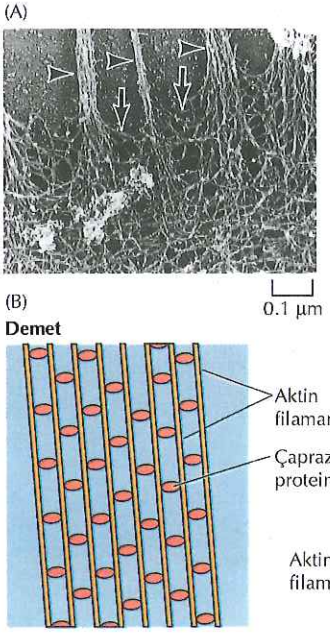
Aktin Filamanlarının Düzenlenmesi

Her bir aktin filamanı hücrede farklı roller oynayan, **aktin demetleri** ve **aktin ağı** olarak adlandırılan iki ana tipte yapılanmıştır (Şekil 11.7). Demetlerdeki aktin filamanları, sıkıca paketlenmiş paralel diziler halinde çapraz bağlantılar yapar. Ağlardaki aktin filamanları ise, yarı katı bir jel özelliğinde üç boyutlu bir tabaka oluşturacak, ortogonal diziler halinde çapraz bağlantılar yapar. Bu yapıların oluşumu aktin filamanlarına farklı şekillerde çapraz bağlantılar yapan çok sayıda aktin-bağlayan protein tarafından sağlanır.

Çapraz bağlantıya katılan aktin-bağlayan proteinlerin hepsinde aktine bağlanan en az iki bölge vardır. Bu bölgeler, onların aktine bağlanmalarını ve iki farklı aktin filamanı arasında çapraz bağlantı yapmalarını sağlar. Bu filamanlar arasındaki etkileşimlerin doğası çapraz bağlayıcı proteinlerin boyut ve şekilleri ile belirlenir (bkz. Şekil 11.7). Demetlerdeki aktin filamanlarına çapraz bağlanan proteinler (**aktin-demetleyici proteinler**), genellikle filamanları birbirlerine yakınlaşmaya zorlayan küçük katı proteinlerdir. Aktin filamanlarının ağlar şeklinde oluşumunu düzenleyen proteinler ise bunun aksine, dikey filamanlarla çapraz bağlantılar yapabilen büyük esnek proteinlerdir. Aktin-çapraz bağlayıcı proteinler, ilgili yapısal birimleri içeren modüler proteinler olabilirler. Özellikle bu proteinlerin bir çoğunda bulunan aktin-bağlayan bölge, yapısal olarak çok benzerdir. Farklı uzunlukta ve esneklikte aralayıcı diziler ile ayrılmıştır ve aralayıcı dizilerdeki bu farklılık, farklı aktin-bağlayan proteinlerin değişik çapraz bağlantılar yapabilmesinden sorumludur.

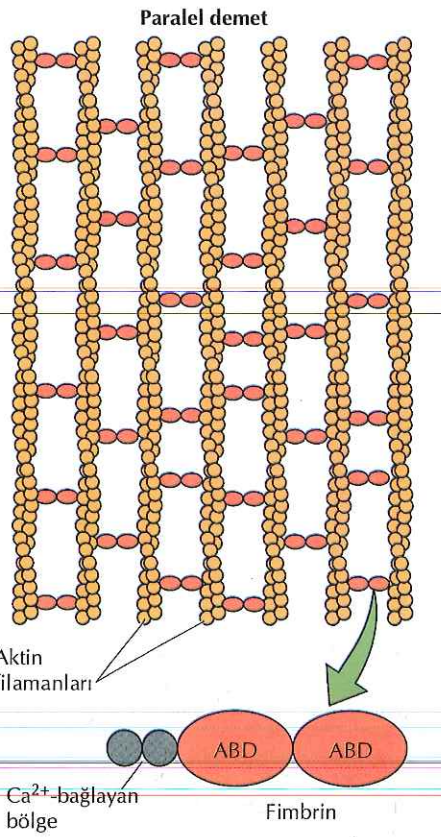
Farklı aktin-demetleyici proteinlere gereksinim duyan, fonksiyonel ve yapısal olarak farklı, iki aktin demeti tipi vardır (Şekil 11.8). Bu demetlerden birinci tip, paralel yerleşimli, yakın aralıklı aktin filamanlarını içerir ve plazma zarındaki mikrovilus gibi çıkıntılara destek olur (bkz.Şekil 11.16 ve 11.17). Bu demetlerdeki bütün filamanlar aynı yüktedir ve artı uçları plazma zarına bitişiktir. Bu yapının oluşumuna katılan demetleyici proteinlere bir örnek olarak **fimbrin** verilebilir. Fimbrin ilk olarak barsak mikroviluslarından izole edilmiştir ve daha sonra birçok farklı hücre tipinin yüzey çıkıntılarında saptanmıştır. Fimbrin, iki komşu aktin-bağlayan bölgesi olan 68 kd luk bir proteindir. Aktin filamanlarına monomer olarak bağlanır ve iki paralel filamanı birbirine yaklaştırır.

Şekil 11.7 Aktin demetleri ve ağı
(A) Makrofaj plazma zarının altında yer alan aktin ağından (oklar) çıkan aktin demetlerinin (okbaşları) elektron mikrografı. Bu demetler filopod adı verilen hücre yüzey çıkıntılarını destekler (bkz. Şekil 11.18). (B) Demet ve ağların şematik düzenlenmesi. Demet yapılarındaki aktin filamanları küçük proteinler aracılığla birbirlerine paralel dizinler halinde çapraz bağlıdır. Bunun aksine, ağlar ortogonal filamanları çapraz bağlayan büyük esnek proteinler ile oluşur. (A, John H. Hartwig'in izniyle, Brigham & Women's Hospital)



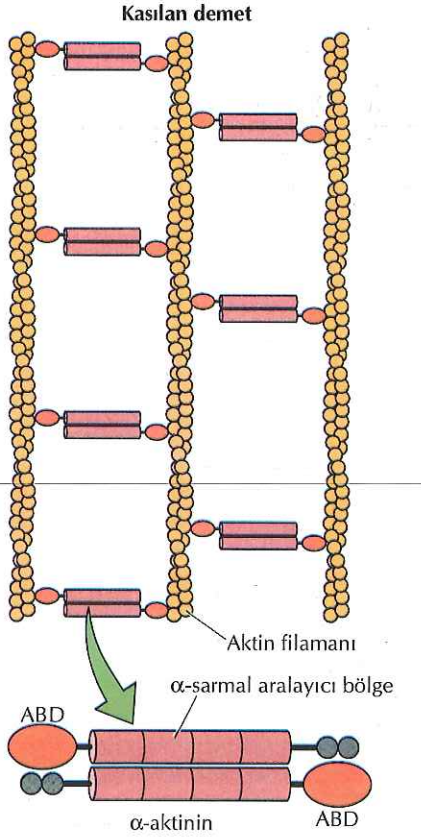
Şekil 11.8 Aktin demetleyici proteinler

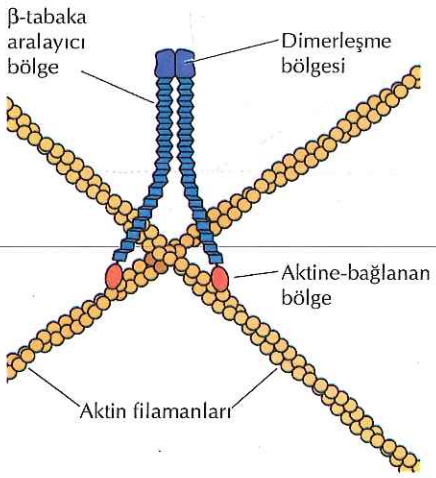
Aktin filamanları, farklı aktin demet proteinleri ile iki demet tipi oluşturur. Fimbrin, yan yana yerleşik olan iki aktin bağlama bölgesine (ABD) sahiptir ve aktin filamanlarını, paralel demetler halinde ve birbirleriyle yaklaşık 14 nm mesafede olacak şekilde çapraz bağlar. Bunun aksine, α-aktinin yapısındaki iki aktin bağlama bölgesi birbiri ile mesafelidir ve filamanları aralarında 40 nm olacak şekilde daha gevşek kasılabilir demetler halinde çapraz bağlar. Hem fibrin hem α–aktinin iki adet Ca^{2+}-bağlama bölgesi içerir ve α–aktinin, dört adet tekrarlayan α sarmal aralayıcı bölgeye sahiptir.



Aktin demetlerinin ikinci tipi daha geniş aralıklı filamanlardan oluşmuştur. Bu demetlerin (**kasılan demetler** olarak adlandırılırlar) daha açık yapısı çapraz bağlayıcı proteini **α-aktininin** özelliklerini yansıtır. Fimbrinin aksine α-aktinin aktine dimer olarak bağlanır, 102 kd luk bir protein olan her bir alt birimin tek bir aktin-bağlanma bölgesi vardır. Bu nedenle, α-aktinin ile çapraz bağlantı yapan filamanlar arasında, fimbrin ile bağlananlardan çok daha büyük mesafe vardır (14 nm yerine 40 nm uzaklık). Filamanlar arasındaki boşluğun artması motor protein miyozinin bu demet içindeki aktinler ile etkileşime girmesine izin verir, bu da demetlerin kasılmasını sağlar (daha sonra anlatılacağı gibi).

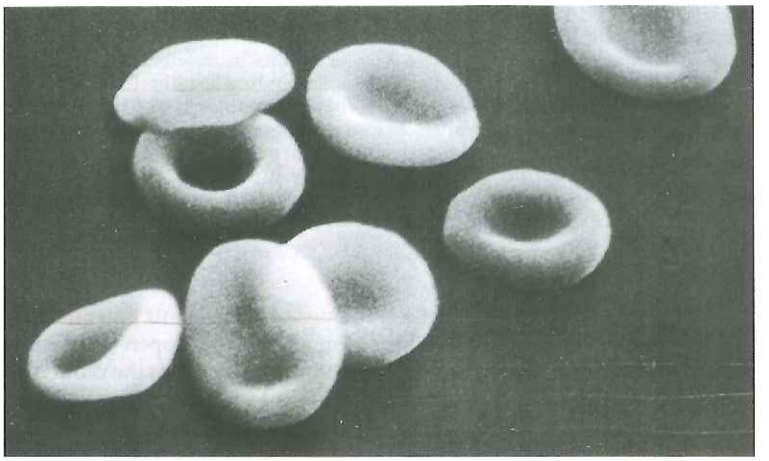
Ağdaki aktin filamanları, **filamin** gibi büyük aktin-bağlayan proteinler ile bir arada tutulur (Şekil 11.9). Filamin (aktin-bağlayan protein ya da ABP-280 olarak da adlandırılır) aktine 280 kd luk alt birimden oluşan bir dimer olarak bağlanır. Aktin-bağlanan bölgeleri ve dimerleşme bölgeleri her bir alt birimin zıt uçlarındadır, bundan dolayı filamin dimeri, her bir kolunun ucunda aktin bağlama bölgesi olan esnek V-şeklinde bir moleküldür. Sonuç olarak, filamin gevşek üç boyutlu bir tabaka yaratarak, ortogonal aktin filamanları arasında çapraz bağlantılar oluşturur. Gelecek bölümde de anlatılacağı gibi, bu gibi aktin filaman ağları, plazma zarının temelini oluşturur ve hücre yüzeyine destek olur. Farklı tiplerdeki aktin ağlarının ve demetlerinin hücrelerdeki özel bölgelere yerleşmeleri kontrol edilir. Bu kontrol kısmen bir diğer aktin-bağlayan protein ailesi olan tropomiyozin ailesi ile sağlanır (Daha sonra tartışılacak).





Şekil 11.9 Aktin ağı ve filamin

Filamin, aktin filamanlarını ortogonal ağa çapraz bağlayan V şeklinde esnek bir molekül oluşturan iki büyük alt birime (280 kd) sahip bir dimerdir. Karboksi ucu dimerleşme bölgesi, tekrarlayan β–tabaka aralayıcı bölgeler aracılığla amino ucundaki aktin bağlama bölgesinden ayrılmıştır.



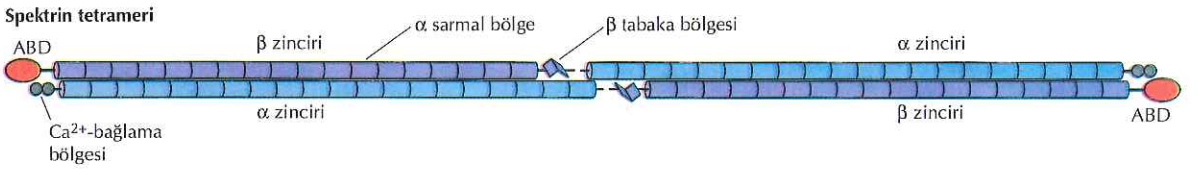
Şekil 11.10 Kırmızı kan hücrelerinin morfolojisi
Alyuvarların tarayıcı elektron mikrografı hücrelerin bikonkav yapısını göstermektedir (Omikron/Photo Researchers, Inc.).

Aktin Filamanlarının Plazma Zarı İle Bağlantıları

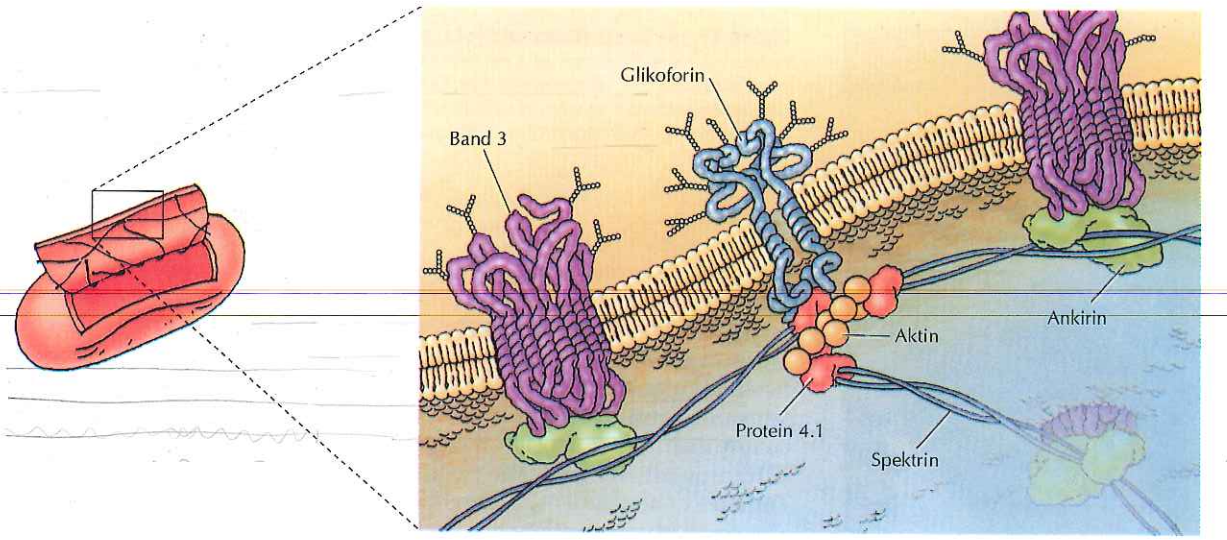
Aktin filamanları, hücrenin çevresinde, yani plazma zarının altında üç boyutlu bir ağ oluşturduğu yerde çok yoğundur (bkz. Şekil 11.7). Bu aktin filamanları ağı ve ilişkili aktin-bağlayan proteinler (**hücre korteksi** olarak adlandırılır) hücre şeklini belirler ve hareketi de içeren çok sayıda hücre yüzeyi aktivitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, aktin hücre iskeleti ile plazma zarı arasındaki bu bağlantı hücre yapı ve fonksiyonunda çok önemlidir.

Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) özellikle plazma zarı (bir sonraki bölümde anlatılacak) ve kortikal hücre iskeleti çalışmaları için çok yararlı bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmalarda kırmızı kan hücrelerinin en önemli avantajı, bunların çekirdek ve diğer hücre içi organellerinin olmamasıdır, bu nedenle kırmızı kan hücrelerinin plazma zarları ve bağlandığı proteinler, diğer hücre tiplerinde oldukça fazla miktarda bulunan hücre içi zarlar ile kontamine olmadan, kolayca elde edilebilir. Ek olarak, insan eritrositlerinin diğer hücre iskeleti elemanları da (mikrotübüller ve ara filamanlar gibi) yoktur, bu yüzden kortikal hücre iskeleti, bikonkav disk şeklini veren asıl belirleyicidir (Şekil 11.10).

Eritrositlerin kortikal iskeletinin yapısal temelini oluşturan ana protein aktin-bağlayan protein **spektrin**dir (Şekil 11.11). Spektrin büyük bir aktin-bağlayan proteinler ailesi olan kalponin ailesinin bir üyesidir, α-aktinin ve fimbrin de bu ailedendir. Eritrosit spektrini, α ve β olarak adlandırılan, moleküler ağırlıkları sırasıyla 240 ve 220 kd olan, iki farklı polipeptid zinciri içeren bir tetramerdir. β zincirinin amino ucunda bir aktin bağlama bölgesi vardır. α ve β zincirleri yan yana bağlanarak dimerler oluştururlar, daha sonra baş bölgelerinin karşılıklı olarak birbirlerine bağlanması ile tetramerler oluşur ve iki aktin-bağlayan bölüm birbirinden yaklaşık 200 nm uzaklaşır. Böylece spektrin tetramerinin iki ucu kısa aktin filamanları ile bağlanabilir, bu



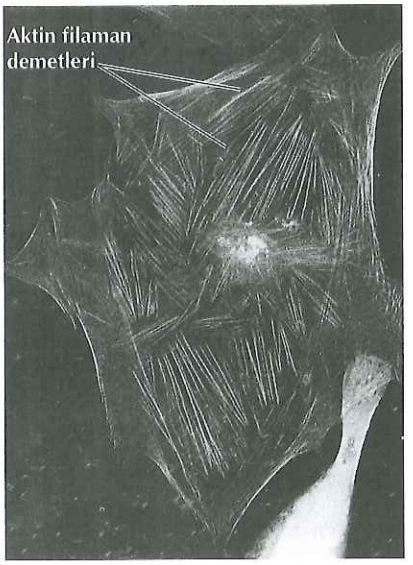
Şekil 11.11 Spektrin yapısı
Spektrin iki α ve β zincirine sahip tetramer yapıda bir moleküldür. Her bir β zinciri amino ucunda tek bir aktin bağlama bölgesine (ADB) sahiptir. α ve β zincirleri, tetramerdeki iki aktin bağlama bölgesini ayıran, çok sayıda α sarmal aralayıcı bölge tekrarlarına sahiptir. α-zincir ise karboksi ucunda iki Ca^{2+} bağlama bölgesi içermektedir.



Şekil 11.12 Eritrosit kortikal hücre iskeletinin plazma zarı ile bağlantısı
Plazma zarı spektrin tetramer ağı ile bağlantılıdır. Spektrinler ise 4.1 proteinleri ile ilişkili olan kısa aktin filamanlarıyla çağraz bağlı haldedir. Spektrin-aktin ağı hücre zarı ile hem spektrinlere hem de ortamda bol miktarda bulunan transmembran protein band 3'e bağlanan ankirin üzerinden etkileşir. Bir ek bağlantı da, protein 4.1'in glikoforine bağlanması ile sağlanır.

da, kırmızı kan hücrelerinin kortikal hücre iskeletini şekillendirecek olan spektrin-aktin ağının oluşumu ile sonuçlanır. Spektrin aktin ağı ve plazma zarı arasındaki ana bağlantı **ankrin** olarak adlandırılan ve hem spektrine, hem de sık rastlanan transmembran bir protein olan band 3 proteininin sitoplazmik bölümüne bağlanan bir protein ile sağlanır. Spektrin-aktin ağı ve plazma zarı arasındaki bir diğer bağlantı da protein 4.1 ile gerçekleşir. Protein 4.1 spektrin-aktin kavşağına bağlandığı gibi, glikoforinin (bir diğer sık rastlanan transmembran protein) sitoplazmik bölgesini de tanır ve bağlanır.

Diğer hücre tiplerinde de, kortikal hücre iskeleti ve plazma zarı arasında kırmızı kan hücrelerinde gözlenenlere benzer bağlantılar vardır. Spektrin ile ilişkili proteinler (eritroid olmayan spektrin **fodrin** olarak da adlandırılır), ankrin ve 4.1 proteini çok çeşitli hücre tiplerinde eritrositlerde tanımlananlara benzer fonksiyonlar görürler. Örneğin 4.1 proteinleri ile ilişkili bir protein ailesi (**ERM proteinleri**) birçok hücre tipinde aktin filamanları ve plazma zarı arasındaki bağlantıyı sağlar ve filamin (bkz. Şekil 11.9) kan trombositlerinin plazma zarı ve aktin filamanları arasındaki ana bağlantıyı oluşturur. Kalponin protein ailesinin bir diğer üyesi olan **distrofin**, iki tip kas distrofisinden (Duchenne ve Becker) sorumlu gen ürünü olduğu için özel bir ilgi görmektedir. Bu X'e bağlı kalıtsal hastalıklar, iskelet kasında ilerleyen dejenerasyon ile sonuçlanmakta, hastalığın şiddetli formlarında hastalar (Duchenne kas distrofisi) onlu yaşlarda veya yirmili yaşların başlarında ölmektedir. Bu hastalıktan sorumlu genin moleküler klonlanması, genin kodladığı bir büyük proteinin (427 kd) Duchenne kas distrofili hastalarda bulunmadığını, Becker kas distrofili hastalarda ise anormal olduğunu göstermiştir. Distrofinin dizilenmesi ile amino ucunda tek bir aktin-bağlanma bölgesinin ve karboksi ucunda ise bir zara bağlanma bölgesinin olduğu belirlenmiştir. Spektrin gibi, distrofin de kas hücresi plazma zarındaki transmembran proteinler ile aktin filamanları arasındaki bağlantıyı oluşturur. Bu transmembran proteinler, kas kasılması sırasındaki hücre kararlılığında önemli rol oynayan, hücre dışı matris ile hücre iskeleti arasındaki bağlantıları da sağlar.

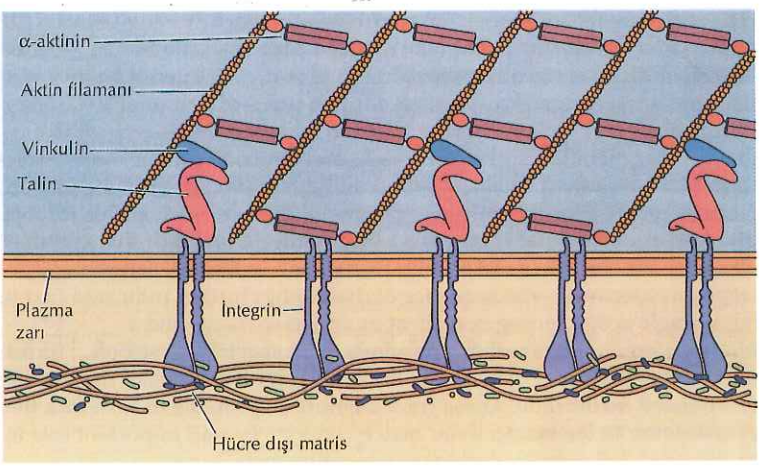


Şekil 11.13 Stres lifleri ve fokal adezyonlar
Floresan boya ile boyalı insan fibroblast aktin filamanlarının floresan mikroskopisi. Stres lifleri, hücrelerin kültür ortam yüzeyi üzerinde tutunma noktalarındaki aktin filaman demetleri (fokal adezyonlar) olarak görülmektedir (Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.).

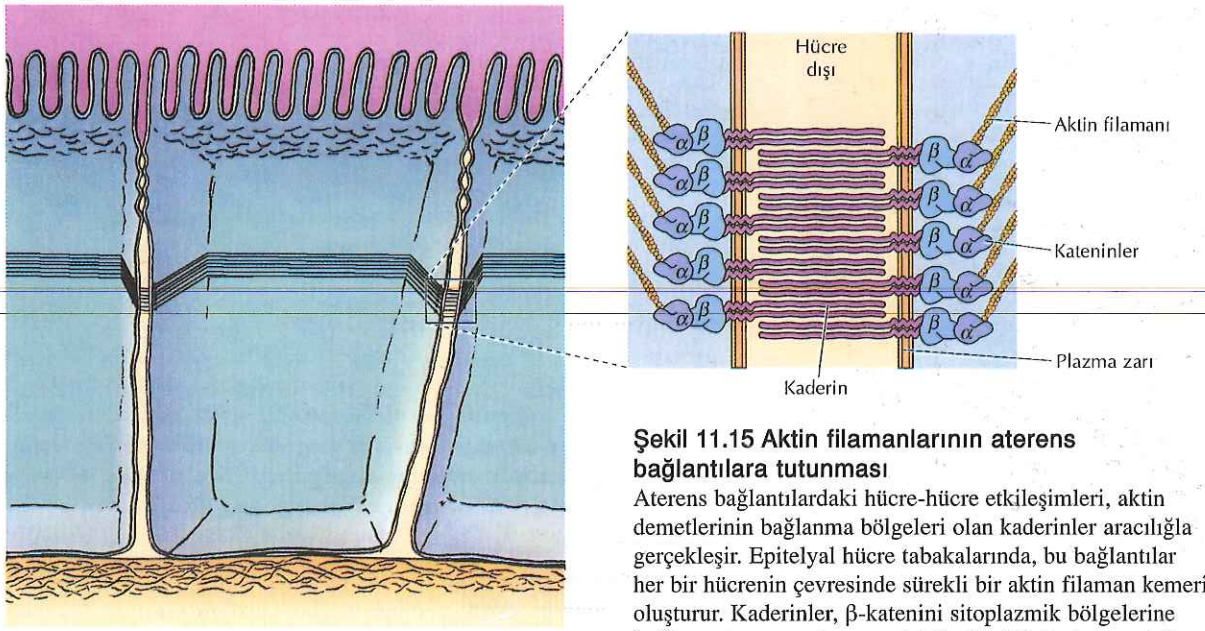
Kırmızı kan hücrelerindeki tek tip yüzeylerin aksine, çoğu hücrenin plazma zarında, komşu hücrelere, doku elemanlarına veya diğer yüzeylere (kültür kaplarının yüzeyi gibi) teması sağlayan özelleşmiş bölgeler vardır. Bu bölgeler aynı zamanda, hücre dokunma alanlarından tutunmuş aktin filaman demetleri için hücre iskeletine tutunma bölgesi olarak işlev görür. Aktin filamanlarının bu bağlantıları hücre kültürlerinde üretilen fibroblastlarda ayrıntılı olarak görülebilmektedir (Şekil 11.13). Bu gibi kültürdeki fibroblastlar kültür kabının yüzeyine yapışan hücre dışı matris proteinleri (Bölüm 12'de anlatıldı) salgılarlar. Daha sonra, fibroblastlar kültür kabına, hücre dışı matrise bağlanan transmembran proteinleri (**integrin** olarak adlandırılan) aracılığı ile tutunurlar. Bu tutunma bölgeleri **stres lifleri** denilen büyük aktin filaman demetleri için tutunma bölgesi olarak da görev yapan alanlar (**fokal adezyonlar** denilen) oluşturur.

Stres lifleri α-aktinin ile çapraz bağlanmış kasılabilir aktin filaman demetleridir, hücreyi bağladığı yüzeye karşı gerilim yaratır. Plazma zarına integrinler ile etkileşim yoluyla fokal adezyonlardan tutunur. Oldukça karmaşık ve tam olarak anlaşılamamış olan bu bağlantılar, **talin** ve **vinkulin** gibi birçok diğer protein ile düzenlenir (Şekil 11.14). Örneğin, hem talin hem de α-aktinin integrinlerin sitoplazmik bölgelerine bağlanırlar. Talin aynı zamanda, daha sonra aktin ile etkileşime girecek olan vinkuline de bağlanır. Fokal adezyonlarda bulunan diğer proteinler aktin filamanlarının tutunmasına katkı sağlayabilir ve bu etkileşimlerin bileşimi aktin filamanları ile plazma zarı arasındaki bağlantıdan sorumlu olabilir.

Aktin hücre iskeleti **aterens bağlantı** olarak adlandırılan, hücre-hücre temas bölgelerine de benzer şekilde tutunur (Şekil 11.15). Epitel hücre tabakalarında bu bağlantılar her hücrenin etrafında kesintisiz kemer benzeri yapı (**adezyon kemeri** olarak adlandırılır) oluşturur. Bu yapı altındaki kasılabilir aktin filamanları demeti, plazma zarı ile bağlantılıdır. Aterens bağlantılardaki hücreler arasında etkileşim, **kaderinler** olarak adlandırılan ve Bölüm 12'de anlatılacak olan, transmembran proteinler ile düzenlenir. Kaderinler aktin filamanları



Şekil 11.14 Stres liflerinin fokal adezyonlarda plazma zarına tutunması
Fokal adezyonlar integrinlerin hücre dışı matris proteinlerine bağlanması ile oluşur. Stres lifleri (α-aktinin ile çapraz bağlı olan aktin filaman demetleri) ise çeşitli proteinleri kapsayan karmaşık etkileşimler üzerinden integrinlerin sitoplazmik bölgeleri ile bağlantı kurar. Olası iki bağlantı şematize edilmiştir:
1) talin, integrine ve aktine bağlanan vinkuline birlikte bağlanır ve 2) integrin α-aktinine bağlanır. Fokal adezyonlarda şematize edilmemiş olan başka proteinler de bulunmaktadır ve bunlar stres liflerinin plazma zarına tutunmasında rol oynayabilir.



Şekil 11.15 Aktin filamanlarının aterens bağlantılara tutunması
Aterens bağlantılardaki hücre-hücre etkileşimleri, aktin demetlerinin bağlanma bölgeleri olan kaderinler aracılığla gerçekleşir. Epitelyal hücre tabakalarında, bu bağlantılar her bir hücrenin çevresinde sürekli bir aktin filaman kemeri oluşturur. Kaderinler, β-katenini sitoplazmik bölgelerine bağlayan transmembran proteinlerdir. β-katenin ise, aktin filamanları ile bağlantı kuran α-katenin ile etkileşir.

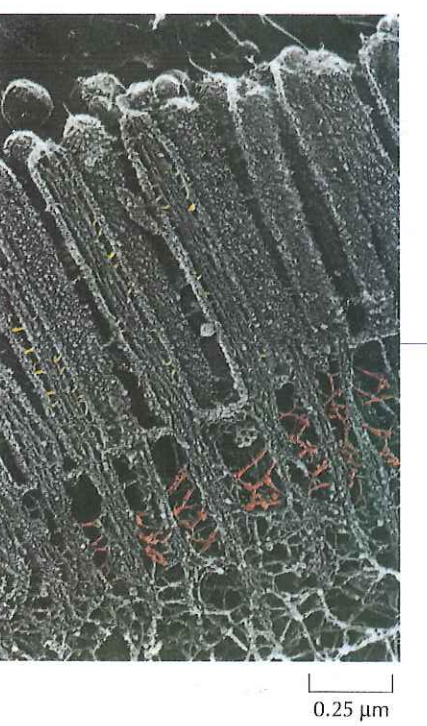
ile bağlantı yapan ve **kateninler** olarak adlandırılan sitoplazmik proteinler ile kompleks oluştururlar.

Hücre Yüzey Çıkıntıları

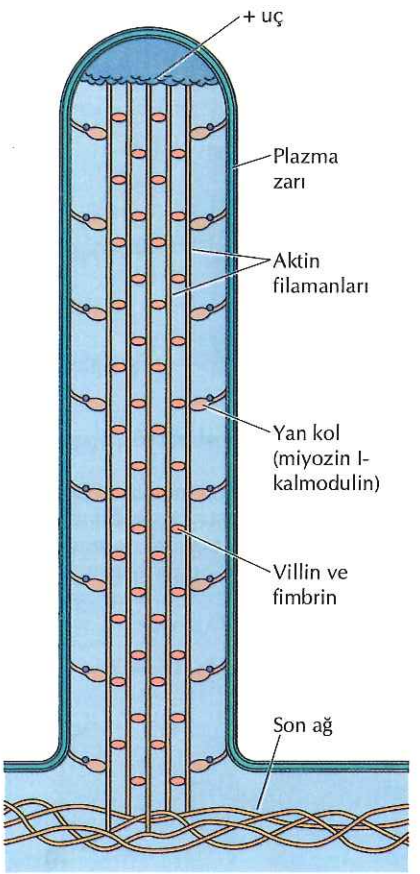
Çoğu hücrenin yüzeyinde hücre hareketi, fagositoz ve besinlerin emilimi gibi özelleşmiş fonksiyonlar ile ilişkili birçok çıkıntı ve uzantılar vardır. Bu hücre yüzey uzantılarının çoğu aktin filamanlarından temel alır, ya kısmen kalıcı ya da hızla yeniden düzenlenen demet veya ağlar ile organize edilirler.

Aktin temelli hücre yüzey çıkıntılarından en iyi tanımlanmış olanı **mikroviluslardır**. Bunlar özellikle barsağı döşeyen epitel hücreleri gibi, emilim ile görevli hücrelerin yüzeylerinde fazla miktarda bulunan, plazma zarının parmak benzeri uzantılarıdır (Şekil 11.16). Bu hücrelerdeki mikroviluslar, apikal yüzey üzerinde hücre başına yaklaşık yüz mikrovilus içeren ve emilim için uygun yüzey alanını 10-20 kat artıran bir tabaka oluşturur (**fırça kenar** olarak adlandırılır). Emilimdeki görevlerinin yanı sıra mikrovillusların özelleşmiş bir tipi, işitsel tüy hücrelerindeki **sterosiller**, ses titreşimlerini saptayarak işitmeden sorumludurlar.

Fazla miktarda bulunmaları ve izole edilmelerindeki kolaylık, sıkıca paketlenmiş 20-30 aktin filamanından oluşan paralel demetler içeren barsak mikroviluslarının ayrıntılı yapısal analizini kolaylaştırmıştır (Şekil 11.17). Bu demetlerdeki filamanlar, kısmen birçok farklı hücre tipinin yüzey çıkıntılarında bulunan, aktin-demetleyen bir protein olan (daha önce anlatılmıştı) fimbrin tarafından çapraz bağlanır. Bununla birlikte barsak mikroviluslarındaki ana aktin-demetleyen protein, barsağı ve böbrek tübüllerini döşeyen hücreler gibi birkaç



Şekil 11.16 Mikrovilusların elektron mikroskop fotoğrafı
Barsak epitel hücrelerindeki mikroviluslar plazma zarındaki parmak benzeri çıkıntılardır. Ucu, ağ olarak tanımlanan korteksin yoğun bölgelerine tutunan aktin demetleri tarafından desteklenirler. (Nobutaka Hirokawa'nın izniyle)



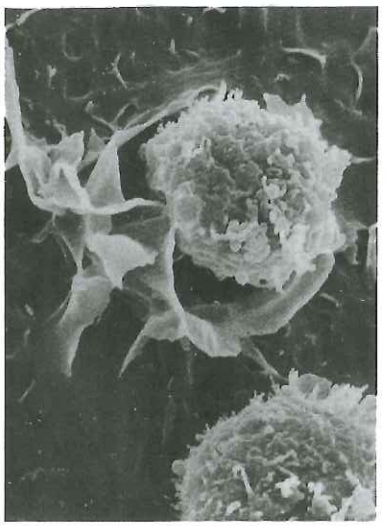
Şekil 11.17 Mikrovilusların düzenlenmesi
Mikrovilli yapısındaki aktin filamanları fimbrin ve villin tarafından paketlenmiş demetler halinde çapraz bağlıdır. Bu filamanlar miyozin 1 ve kolmodulin içeren yan kollar aracılığla, plazma zarına boydan boya tutunur. Aktin filamanlarının artı uçları mikrovillusun ucunda henüz tanımlanmamış olan protein yapılarının içine gömülü haldedir.

özelleşmiş hücre tipindeki mikroviluslarda bulunan 95 kd luk bir protein olan **villin**dir. Mikroviluslardaki aktin demetleri boylu boyunca miyozin I ile bağlanmış kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulini içeren yan kollar tarafından plazma zarına tutunmuştur, bu, plazma zarının mikroviluslardaki aktin demetleriyle birlikte hareketi ile ilişkili olabilir. Taban bölümünde aktin demetleri, aktin korteksinin son ağ olarak adlandırılan, spektrince zengin bölgesine tutunmuştur, bu yapı mikrovilusları çapraz bağlar ve sabitler.

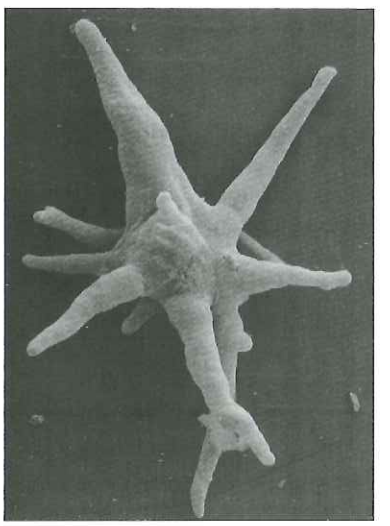
Mikrovilusların aksine birçok yüzey çıkıntısı çevresel uyarılara yanıt olarak oluşan geçici yapılardır. Bu yapıların birçok tipi, hareket eden hücrelerin öncü ucunda bulunur ve hücre hareketi ile ilişkilidir (Şekil 11.18). **Psödopodlar** üç-boyutlu ağ şeklinde çapraz bağlanmış aktin filamanlarından oluşan orta genişlikte uzantılardır, fagositoz ve amiplerin bir yüzeyde hareket etmesinden sorumludurlar. **Lamellipodlar,** fibroblastların öncü ucunda bulunan geniş, levha benzeri uzantılardır ve benzer şekilde aktin filaman ağı içerirler. Birçok hücrede plazma zarının aktin demetleri ile desteklenmiş ince uzantıları olan **mikrodiken** veya **filopodlar** bulunur. Bu yapıların oluşumu ve geri çekilmesi, daha sonra da anlatılacağı gibi, aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışması ile düzenlenir.

Şekil 11.18 Fagositoz ve hücre hareketinde yer alan hücre yüzey çıkıntısı örnekleri
(A) Fagositoz sırasında makrofaj yalancı ayakları (psödopod) ile tümör hücresinin sarılmasını gösteren tarayıcı elektron mikroskop fotoğrafı (B) Uzamış birkaç yalancı ayak içeren amip (C) Lamellipod (L) ve filopod (ok ile gösterilen) yapılarına sahip doku kültür hücresi (A,K. Wasserman/Visuals Unlimited; B, Stanley Flegler/Visuals Unlimited; C, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

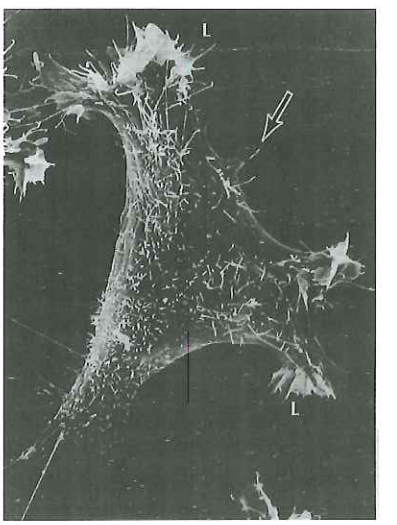
(A)



(B)



(C)



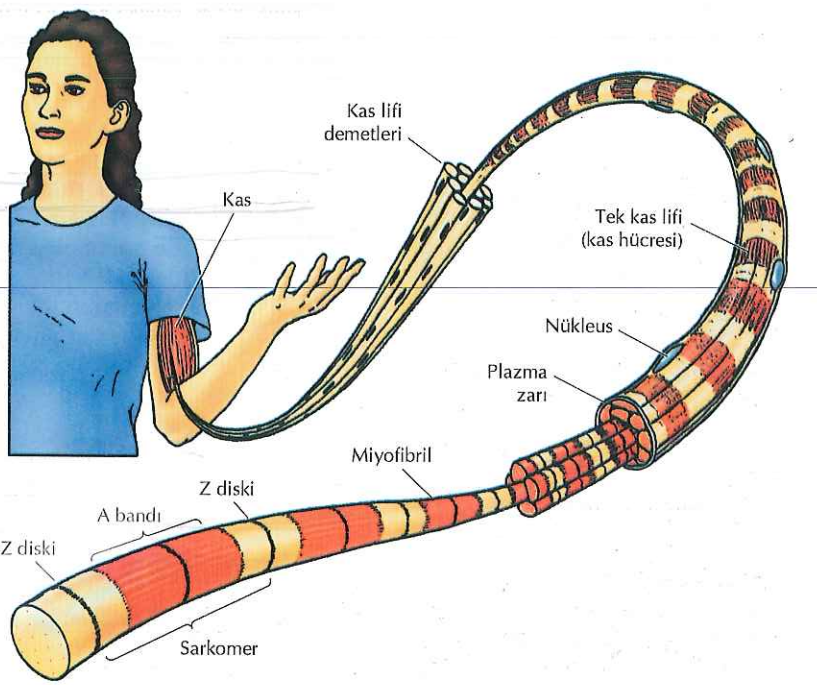
Aktin, Miyozin ve Hücre Hareketi

Genellikle miyozin ile bağlantılı olan aktin filamanları, hücre hareketlerinin birçok tipinden sorumludur. **Moleküler motor**ların ön modeli olan **miyozin**, ATP formundaki kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştüren, böylece güç ve hareket meydana getiren bir proteindir. Bu gibi hareketlere en iyi örnek, aktin-miyozin etkileşimlerini ve miyozin molekülünün motor aktivitesini anlamak için bir model oluşturan kas kasılmasıdır. Ancak, aktin miyozin etkileşimleri yalnızca kas kasılmasından değil, kas dışındaki hücrelerin hücre bölünmesini de içeren, çok çeşitli hareketlerinin gerçekleşmesinden de sorumludur. Bu nedenle, aktin miyozin etkileşimleri hücre biyolojisinde çok önemli role sahiptir. Ayrıca, aktin hücre iskeleti hücrelerin bir yüzeyde ilerlemesini sağlayan sürünme hareketlerinden de sorumludur. Bu hareketler, aktin-miyozin etkileşimleri kadar, direkt aktin polimerleşmesi ile de yönlendiriliyor gibi görünmektedir.

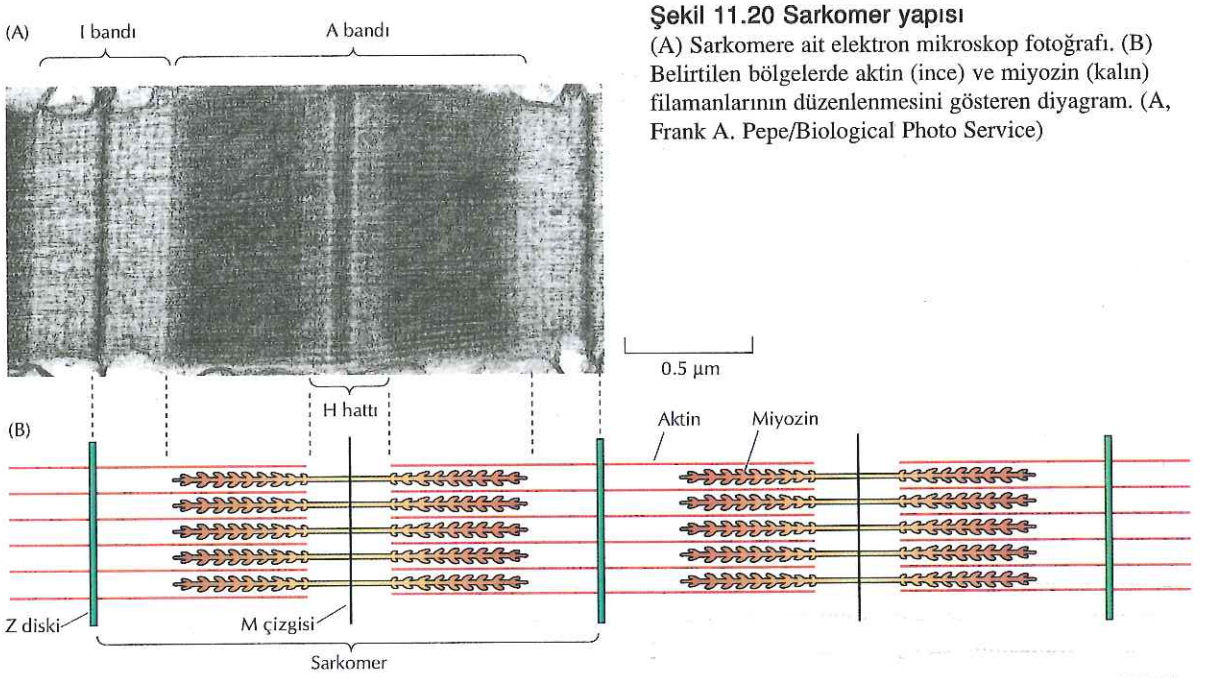
Kas Kasılması

Kas hücreleri tek bir görev için özelleşmiş hücrelerdir: kasılma. Yapı ve fonksiyonlardaki bu özelleşme kası, hücre hareketlerini hücresel ve moleküler düzeyde çalışmak için çok iyi bir model yapmaktadır. Omurgalılarda üç farklı kas hücresi tipi vardır: bütün istemli hareketlerden sorunlu iskelet kası, kalpten kan pompalayan kalp kası ve mide, barsak, uterus ve kan damarları gibi organların istemsiz hareketlerinden sorumlu olan düz kas. Hem iskelet hem de kalp kasında kasılmayı sağlayan elemanlar, enine-çizgili tipik bir görüntü verecek şekilde çok iyi düzenlenmiş diziler halinde bulunur. İskelet kasındaki bu yapıların tanımlanması, kas kasılmasının ve aktin temelli diğer hücre hareketlerinin moleküler düzeyde anlaşılmasında öncü olmuştur.

İskelet kasları, gelişim sırasında birçok hücrenin birleşmesi ile yapılanan, tek tek büyük hücrelerden (yaklaşık 50 μm çapında ve birkaç santimetreye kadar uzunlukta) oluşmuş **kas lifi** demetleridir (Şekil 11.19). Sitoplazmalarının büyük bölümünü iki tip filamanın; kalın miyozin filamanları (yaklaşık 15 nm çapında) ve ince aktin filamanları (yaklaşık 7 nm çapında) oluşturduğu silindirik demetler halindeki **miyofibriller** kaplar. Her miyofibril, **sarkomerler** olarak adlandırılan kasılabilir birimler zinciri olarak yapılanmıştır. Bu yapı iskelet ve kalp kasındaki çizgili görüntüden sorumludur.



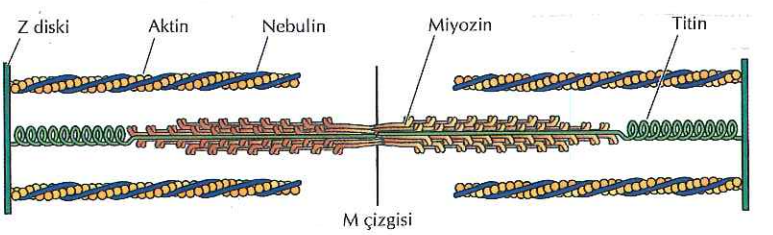
Şekil 11.19 Kas hücrelerinin yapısı
Kaslar, kas lifleri olarak tanımlanan, tek büyük hücre demetlerinden oluşur. Bu hücreler hücre füzyonu ile oluşur ve çok sayıda nukleus içerir. Her bir kas lifi aktin ve miyozin filaman demetlerine sahip çok sayıda miyofibril yapılar içerir. Bu aktin ve miyozin filamanları ise sarkomer adı verilen tekrarlayan birimlerin bulunduğu zincir şeklindeki yapılardır.



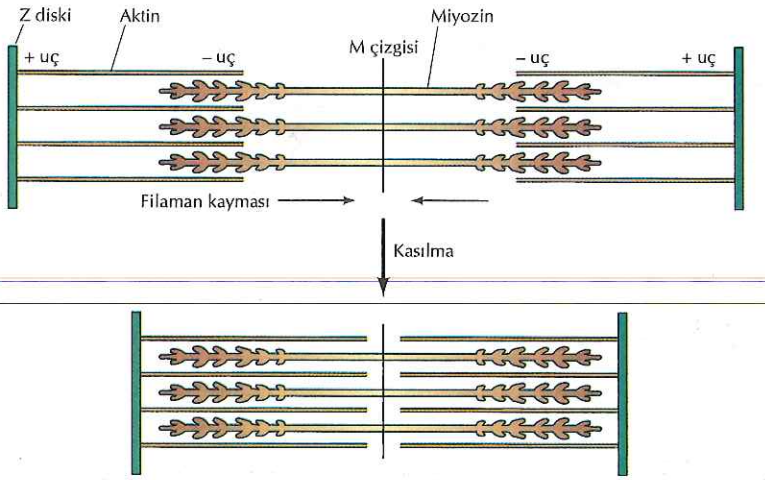
Şekil 11.20 Sarkomer yapısı
(A) Sarkomere ait elektron mikroskop fotoğrafı. (B) Belirtilen bölgelerde aktin (ince) ve miyozin (kalın) filamanlarının düzenlenmesini gösteren diyagram. (A, Frank A. Pepe/Biological Photo Service)

Sarkomerler (yaklaşık 2.3 µm uzunluğunda), birçok farklı bölge içerir. Bu bölgeler, kas kasılmasının mekanizmasını aydınlanmasına önemli katkı sağlayan elektron mikroskop ile ayırt edilebilir (Şekil 11.20). Her sarkomerin ucu Z diski olarak tanımlanır. Her sarkomerde koyu bant (polarize ışıkta anizotrop göründüğü için A bandı olarak adlandırılmıştır) ve açık bant (izotrop olduğu için I bandı denilmiştir) sıra ile yerleşmiştir. Bu bantlar miyozin filamanlarının varlığını ya da yokluğunu gösterir. I bantlarında yalnızca ince (aktin) filamanlar bulunurken, A bantlarında kalın (miyozin) filamanlar vardır. Miyozin ve aktin filamanları A bandının kenardaki bölümünde üst üste gelirler, orta bölgede (H hattı denilen) yalnızca miyozin bulunur. Aktin filamanları, Z diskine çapraz bağlayıcı protein olan α-aktinini içeren, artı uçları ile bağlanmışlardır. Miyozin filamanları ise sarkomerin ortasındaki M çizgisine tutunmuştur.

İki ek protein (**titin** ve **nebulin**) de sarkomer yapı ve kararlılığına katkıda bulunur (Şekil 11.21). Titin aşırı büyük bir proteindir (3000 kd) ve tek bir titin molekülü M çizgisinden Z diskine kadar uzanır. Bu uzun titin molekülleri miyozin filamanlarını sarkomerin merkezinde tutan yaylar gibi görev yapar ve kas eğer çok uzadı ise hızla geri dönmesini sağlayan gerilimi sağlar. Nebulin filamanları aktin ile



Şekil 11.21 Titin ve nebulin
Titin molekülleri Z diskinden M çizgisine uzanır ve miyozin flamanlarını sarkomer merkezinde tutmak üzere yay gibi davranır. Nebulin molekülleri Z diskinden uzanır ve bağlı oldukları aktin filamanlarının uzunluğunu belirledikleri düşünülmektedir.



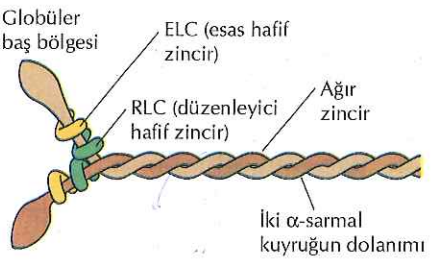
Şekil 11.22 Kas kasılmasının kayan filaman modeli
Aktin filamanları miyozin filamanlarını geçerek sarkomerin ortasına doğru kayar. Sonuçta filaman uzunluğu değişmeksizin sarkomer kısalır.

bağlıdır ve aktinlerin uzunluklarını belirleyen cetveller olarak aktin filamanlarının yapılanmasını kontrol ettikleri düşünülmektedir.

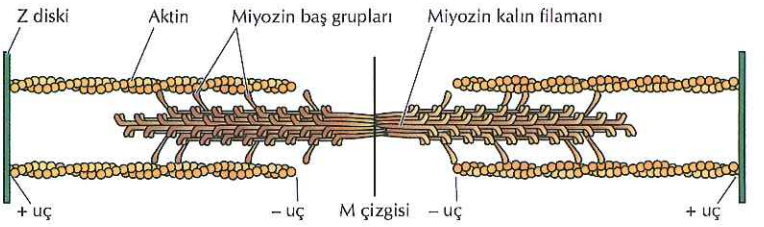
Kas kasılmasının anlaşılmasının temelini kayan filaman modeli oluşturur. Bu model ilk kez 1954'de, hem Andrew Huxley ve Ralph Niedergerke, hem de Hugh Huxley ve Jean Hanson tarafından önerilmiştir (Şekil 11.22). Kas kasılması sırasında, her sarkomer, Z disklerini birbirine daha yakın hale getirerek kısalır. A bandının genişliği değişmez, fakat her iki I bandı ve H hattı hemen tamamen kaybolur. Bu değişiklikler aktin ve miyozin filamanlarının birbirlerinine doğru kayması ile açıklanır, yani aktin filamanları A bandına ve H bölgesine gider. Böylece kas kasılması aktin ve miyozin filamanları arasında göreceli olarak, birinin diğerine doğru hareket etmesi ile gerçekleşen bir etkileşim ile sonuçlanır. Bu etkileşimin moleküler temeli, miyozinin aktin filamanlarına bağlanarak, filamanların kaymasını yönlendiren bir motor görevi yapmasıdır.

Kasta bulunan miyozin tipi (**miyozin II**), iki özdeş ağır zincir (her biri yaklaşık 200 kd) ve iki çift hafif zincir (her biri yaklaşık 20 kd) içeren çok büyük bir proteindir (yaklaşık 500 kd) (Şekil 11.23). Her ağır zincir, globüler bir baş bölgesi ve uzun bir α-sarmal kuyruk içerir. İki ağır zincirin α-sarmal kuyrukları birbirleri etrafında dönerek bir dimer oluşturmak üzere dönen sarmal şeklinde kıvrılır ve iki hafif zincirin baş bölgesindeki boyun kısmından bağlanmaları ile tam bir miyozin II molekülü oluşur.

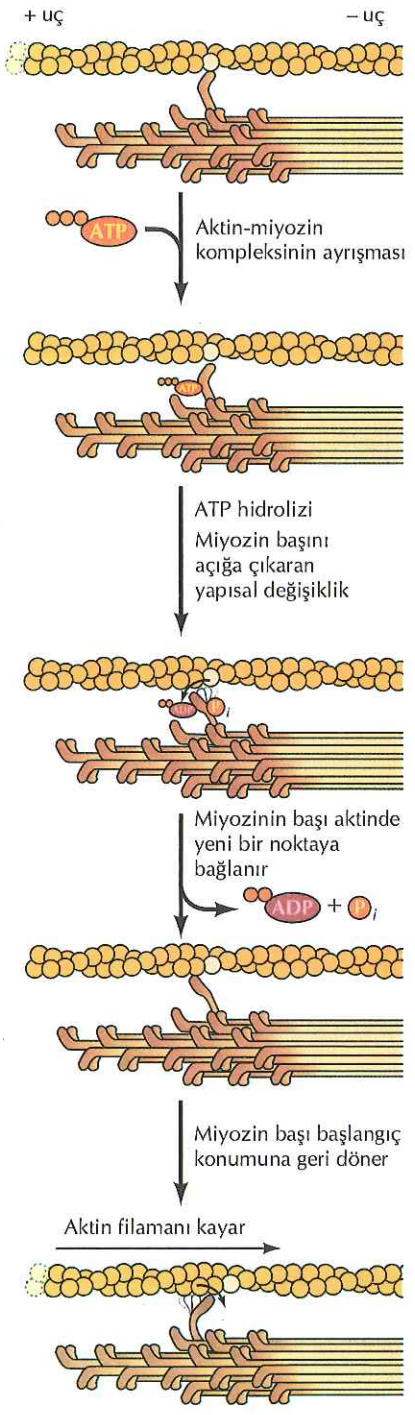
Kastaki kalın filamanlar, kuyrukları arasındaki etkileşimler ile paralel, üst üste çakışan düzensiz bir dizi halinde bir araya gelmiş yüzlerce miyozin molekülü içerir (Şekil 11.24). Miyozinin globüler baş kısmı kalın ve ince filamanlar arasında köprü oluşturacak şeklide aktine bağlanır. Kalın filamanlardaki miyozin moleküllerinin, sarkomerin M çizgisinde zıt yönelimli olması önemlidir. Aktin filamanlarının polaritesi (artı uçlarından Z diskine tutunmuşlardır) de benzer olarak M çizgisinde zıt yönelimdedir, böylece aktin ve miyozin



Şekil 11.23 Miyozin II
Miyozin II molekülleri, iki ağır zincir ve iki çift hafif zincir (esas ve düzenleyici hafif zincirler olarak tanımlanır) içerir. Ağır zincirler globüler baş bölgelerine ve dimer yapısı oluşturmak üzrre birbiri etrafına dolanan uzun α–sarmal kuyruklara sahiptir.



Şekil 11.24 Miyozin kalın filamanların düzenlenmesi
Kalın filamanlar, birkaç yüz miyozin II molekülünün bir dizin halinde birleşmesi sonucu oluşur. Miyozinin globüler başları aktini bağlar ve miyozin ve aktin filamanları arasında çapraz köprüler meydana getirir. Hem aktin hem de miyozin filamanlarının yerleşimi M çizgisinde tersine döner, bu nedenle göreli polaritesi sarkomerin her iki tarafında da aynıdır.



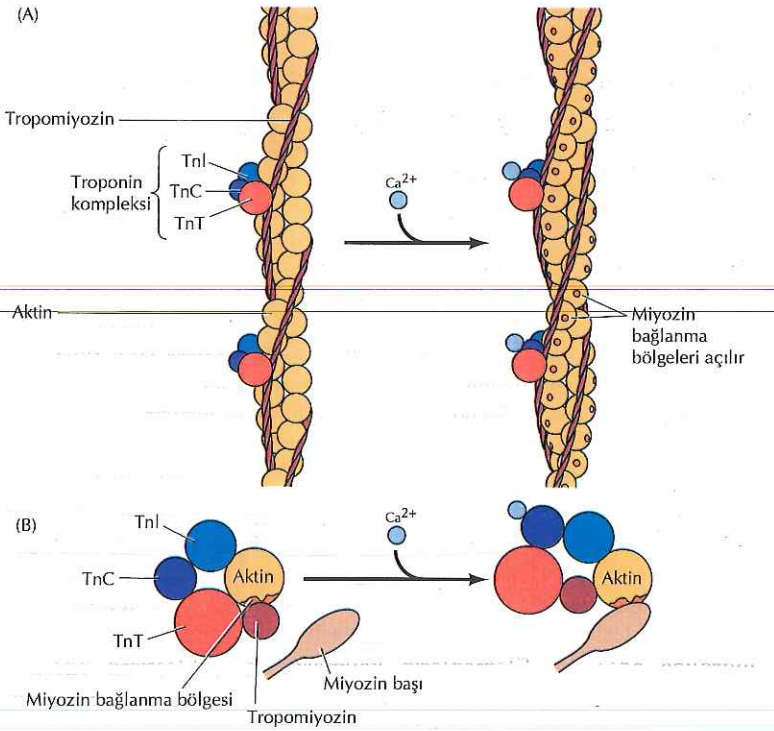
Şekil 11.25 Miyozin davranış modeli
ATP'nin bağlanması miyozini aktinden ayırır. ATP'nin hidrolizi, miyozin baş grupların açılmasını sağlayan konformasyonel değişikliğe neden olur. Bunu miyozin başının aktin filamanı üzerinde yeni bir pozisyona bağlanması ve ADP ile Pi'nin salınımı takip eder.Miyozin başının orijinal konformasyonunu alması, aktin filamanının kaymasını sağlar.

filamanlarının göreli yönlenimleri sarkomerin her iki yarısında da aynıdır. Daha sonra da anlatılacağı gibi, miyozinin motor aktivitesi, baş gruplarının aktin filamanları boyunca artı uca doğru hareketini sağlar. Bu hareket aktin filamanlarını sarkomerin iki tarafından M çizgisine doğru kaydırır, sarkomeri kısaltır ve kas kasılması ile sonuçlanır.

Aktine bağlanmasına ek olarak, miyozin başları ATP'ye bağlanır ve hidrolize eder, bu filamanların kaymasını gerçekleştiren enerjiyi sağlar. Kimyasal enerjiden harekete bu dönüşüm, ATP bağlanması sonucunda miyozinin şeklindeki değişiklikler tarafından düzenlenir. Genelde kabul gören bir model (dönen-çapraz-köprü modeli) ATP hidrolizinin, miyozin başları ve aktin arasındaki bağlantıların döngüler halinde tekrarlanmasına yol açmasıdır. Her döngü sırasında, miyozindeki konformasyonel değişiklikler miyozin başlarının aktin filamanları boyunca hareket etmesi ile sonuçlanır.

Moleküler mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılmamasına karşın, miyozinin fonksiyonları için kabul edilebilir bir model, aktin filamanları boyunca miyozin hareketlerini belirleyen *in vitro* çalışmalardan (James Spudich ve Michael Sheetz tarafından geliştirilen bir sistem) ve Ivan Rayment ve arkadaşları tarafından miyozinin üç boyutlu yapısının tanımlanmasından köken almıştır (Şekil 11.25). Döngü, miyozinin (ATP olmadığında) sıkıca aktine bağlanması ile başlar. ATP bağlanınca, miyozin-aktin kompleksi ayrışır ve daha sonra ATP hidrolizi miyozinin şekilsel değişikliğine neden olur. Bu değişiklik miyozinin hafif zincirlerine bağlanan boyun bölgesini etkiler (bkz. Şekil 11.23) ve miyozin başlarının yerini yaklaşık 5 nm kadar değiştiren kaldıraç kolları gibi iş görür. Hidroliz ürünleri (ADP ve P_i) miyozin başına bağlı kalır, buna "kurulmuş" pozisyon da denilebilir. Bu durumda miyozin başları aktin filamanı üzerine yeni bir yerleşimden yeniden bağlanır, bu bağlanma sonucunda ADP ve P_i serbest kalır ve "güç dalgası" nın tetiklenmesi ile miyozin başları başlangıçtaki şekline döner, böylece aktin filamanları sarkomerin M çizgisine doğru kayar.

İskelet kasının kasılması sinirsel uyarı ile tetiklenir, bu da yüksek konsantrasyondaki Ca^{2+} iyonlarını depolayan ve endoplazmik



Şekil 11.26 Tropomiyozin ve troponinlerin aktin filamanları ile bağlantısı

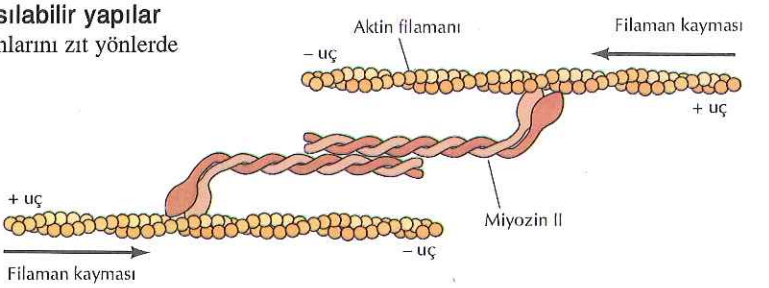
(A) Tropomiyozin aktin filamanları ile uzunlamasına bağlanır ve çizgili kasta üç adet troponin (troponin I, TnI; troponin C, TnC; troponin T, TnT) içeren bir komplekse bağlıdır. Ca^{2+} un yokluğunda tropomiyozin-troponin kompleksi miyozinin aktine bağlanmasını engeller. Ca^{2+}'nın TnC'ye bağlanması kompleksi değiştirir, inhibisyon ortadan kalkar ve kasılmanın ilerlemesini sağlar. (B) Enine kesitsel görünüm

retikuluma benzeyen, özelleşmiş bir iç zarlar ağı olan **sarkoplazmik retikulumdam** Ca^{2+} salınmasını uyarır. Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımı, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonunu yaklaşık 10^{-7} ile 10^{-5} arsında artırır. Artmış Ca^{2+} konsantrasyonu, aktin filamanlarına bağlı iki aksesuar protein olan **tropomiyozin** ve **troponin** üzerinden kas kasılmasını sinyaller (Şekil 11.26). Tropomiyozin, aktin filamanlarının oluşturduğu oluğa uzunlamasına bağlanan, fibröz bir proteindir. Çizgili kasda, her tropomiyozin molekülü troponine bağlıdır ve üç polipeptid ile kompleks oluşturur: troponin C (Ca^{2+}-bağlayan), troponin I (inhibitör) ve troponin T (tropomiyozin-bağlayan). Ca^{2+} konsantransyonu düşük olduğu zaman, troponin-tropomiyozin kompleksi aktin ve miyozin bağlantısını bloklar, böylece kas kasılamaz. Yüksek konsantrasyonda iken, troponin C ye Ca^{2+} bağlanması kompleksin konumunu değiştirir, inhibisyonu ortadan kaldırır ve kasılmanın gerçekleşmesini sağlar.

Aktin ve Miyozinin Kas Dışı Hücrelerde Kasılabilir Yapılanmaları

Aktin ve miyozinin kas liflerinin küçük-ölçekli bir tipi gibi kasılabilir birlikteliği, kas dışındaki hücrelerde de bulunmaktadır. Kas hücrelerindeki gibi, bu kasılabilir yapılanmada da aktin filamanları, 15-20 miyozin II molekülünden oluşan bipolar miyozin II filamanları

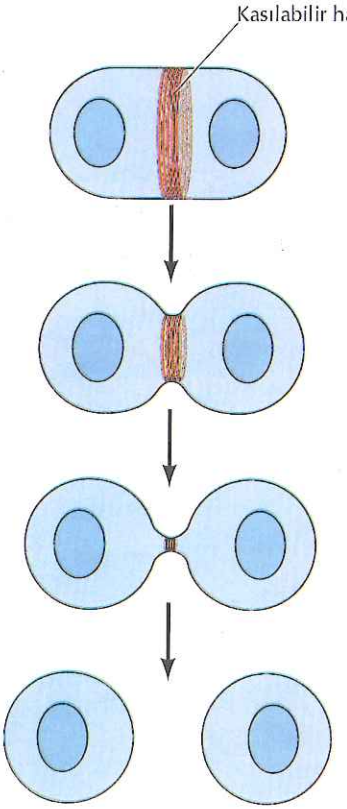
Şekil 11.27 Kas dışındaki hücrelerde kasılabilir yapılar
Miyozin II'nin bipolar filamanları aktin filamanlarını zıt yönlerde kaydırarak kasılmayı sağlar.



ile bir araya getirilir, aktin filamanlarının birbirlerine doğru kayması ile kasılma meydana gelir (Şekil 11.27). Kas dışı hücrelerdeki kasılabilir demetlerdeki aktin filamanları, tropomiyozin ile de bağlantılıdır. Bu bağlantı aktin üzerindeki bağlanma bölgesi için filamin ile yarışa girerek miyozin II ile etkileşimini kolaylaştırır.

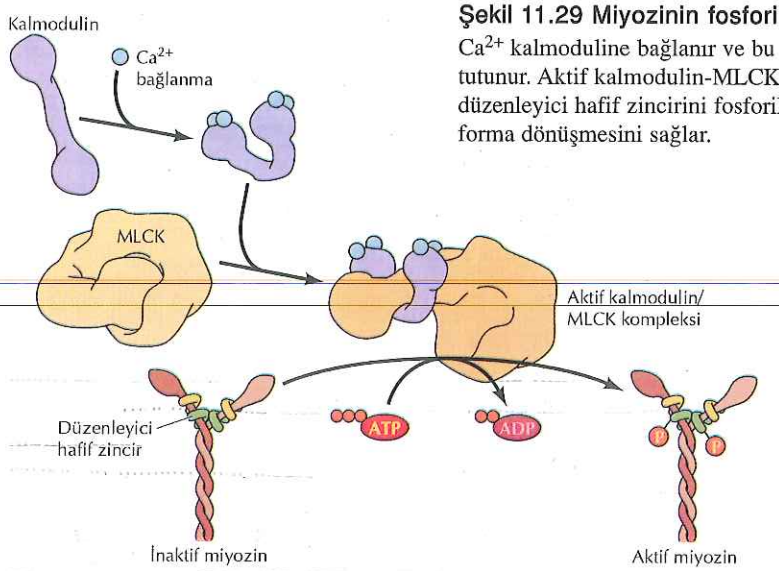
Kas dışı hücrelerin kasılabilir yapılanmalarına örnek olarak stres lifleri ve adezyon kemerleri verilebilir. Bu konu daha önce bu bölümde, hücre-yüzey ve hücre-hücre temaslarındaki aktin hücre iskeleti bağlantıları anlatılırken tartışılmıştı (bkz. Şekil 11.14 ve 11.15). Stres liflerinin kasılması, hücrede tutunduğu bir yüzeyi (örn., hücre dışı matris) üzerine çekmesini sağlayan bir gerilim oluşturur. Adezyon kemerlerinin kasılması epitel hücre tabakasının şeklini değiştirir: bu olay embriyo gelişimi sırasında, özellikle epitel hücre tabakalarının tüp gibi yapılar oluşturacak şekilde katlandığı zaman çok önemlidir.

Kas dışı hücrelerde aktin-miyozin kasılmasına en iyi örnek **sitokinez,** mitoz sonrasında bir hücrenin ikiye bölünmesi, ile sağlanır (Şekil 11.28). Hayvan hücrelerinde mitozun sonlarına doğru plazma zarının hemen altında, aktin filamanları ve miyozin II içeren bir **kasılabilir-halka** oluşur. Bunun kasılması plazma zarını kademeli olarak içeriye doğru çeker, hücrenin ortası giderek daha fazla daralır ve hücreyi ikiye ayırır. Kasılma sırasında kasılabilir halkanın kalınlığı değişmez, bu da kasılma devam ederken aktin filamanlarının yapılanmasının bozulduğunu gösterir. Hücre bölünmesinden sonra halka tamamen yok olur.



Çizgili kasta aktin-miyozin kasılmasının kontrolü, daha önce de bahsedildiği gibi, Ca^{2+}'un troponine bağlanması ile sağlanır. Buna karşın, kas dışı hücrelerde ve düz kasta kasılma, miyozin hafif zincirlerinden düzenleyici hafif zincir olarak adlandırılan birisinin fosforillenmesi ile kontrol edilir (Şekil 11.29). Düzenleyici hafif zincirin fosforillenmesinin, bu hücrelerde en azından iki etkisi vardır: miyozinin filamanlar halinde yapılanmasını başlatır, miyozinin kasılma için gerekli katalitik aktivitesini artırır. Bu fosforillenmeyi katalizleyen enzim **miyozin hafif-zincir kinaz**dır. Bu kinaz, Ca^{2+} bağlayan bir protein olan **kalmodulin** ile bağlanma yoluyla düzenlenir. Sitozoldeki Ca^{2+}'un artması kalmodulinin kinaza bağlanmasını sağlar, bu da miyozinin düzenleyici zincirinin fosforillenmesi ile sonuçlanır. Bu yüzden sitozoldeki Ca^{2+}'un artması, indirekt yolla olsa da, çizgili kastaki gibi düz kasta ve kas dışı hücrelerde de miyozinin aktive olmasından sorumludur.

Şekil 11.28 Sitokinez
Mitozun (nükleer bölünme) tamamlanmasını takiben aktin filamanları ve miyozin II'den oluşan kasılabilir halka yapısı hücreyi ikiye böler.



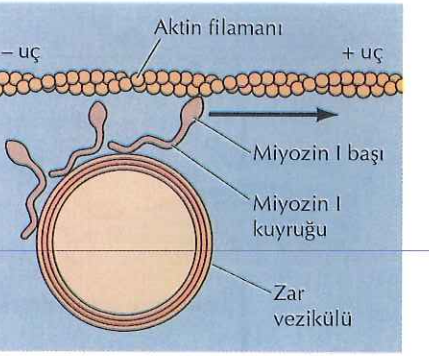
Şekil 11.29 Miyozinin fosforillenme ile düzenlenmesi
Ca^{2+} kalmoduline bağlanır ve bu yapı miyozin hafif zincir kinaza (MLCK) tutunur. Aktif kalmodulin-MLCK kompleksi daha sonra miyozin II düzenleyici hafif zincirini fosforiller ve miyozinin inaktif formdan aktif forma dönüşmesini sağlar.

Sıra Dışı Miyozinler

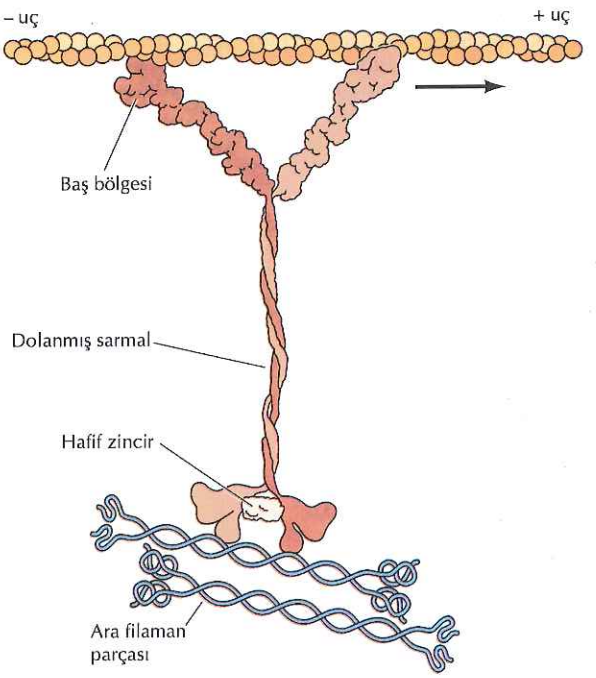
Kas dışı hücrelerde Miyozin II'ye ("sıradan" iki-başlı miyozin) ek olarak birçok farklı miyozin tipleri bulunur. Miyozin II'nin aksine, bu "sıra dışı" miyozinler filamanlar oluşturmazlar ve bu yüzden kasılma ile ilişkili değildirler. Bununla birlikte zar vezikülleri ve organellerin aktin filamanları boyunca taşınması, fagositoz ve amipte psödopodların uzaması gibi çok çeşitli hücre hareketi ile ilişkilidirler (bkz Şekil 11.18).

Bu, sıra dışı miyozinlere örnek olarak **miyozin I** ailesi verilebilir (Şekil 11.30). Miyozin I proteinleri de moleküler motor olarak işlev gören miyozin II'dekine benzer globüler bir baş grubu içerirler. Ancak, miyozin I ailesi üyeleri, miyozin II'deki gibi uzun kuyrukları olmayan çok daha küçük moleküllerdir (memeli hücrelerinde yaklaşık 110 kd) ve dimer oluşturmazlar. Bunun yerine kuyrukları, zar vezikülleri ya da organeller gibi diğer yapılara bağlanabilir. Böylece Miyozin I'in bir aktin filamanı boyunca hareketi, kendisine tutunmuş kargonun taşınmasını sağlayabilir. Miyozin I'in bir görevi de, barsak mikroviluslarının plazma zarlarındaki aktin demetleri ile bağlantılı yan kollar oluşturmaktır (bkz. Şekil 11.17). Bu yapılarda, miyozin I'in motor aktivitesi, plazma zarını aktin demeti ile birlikte, mikrovillusların uçlarına doğru hareket ettirebilir. Miyozin I'in bir diğer fonksiyonu da vezikül ve organellerin aktin filamanları boyunca taşınması ve fagositoz ya da yalancı ayak uzaması sırasında plazma zarının hareketinin sağlanması olabilir.

Miyozin I ve II'ye ek olarak, en az 12 farklı sıra dışı miyozin (III'den XIV'e kadar) tanımlanmıştır. Sıra dışı bu miyozinlerin bazıları miyozin I gibi tek-başlı iken, miyozin V (Şekil 11.31) gibi diğer bazıları, miyozin II gibi çift-başlıdır. Bu sıra dışı miyozinlerin çoğunun fonksiyonları henüz bilinmemektedir, ancak bazılarının kargo taşınmasında ve organel hareketlerinde (miyozin V ve VI), bazılarının ise görme (miyozin III) ve işitme (miyozin VI ve VII) gibi duysal işlevlerde önemli rollerinin olduğu açıkça gösterilmiştir. Bunun dışında, bu miyozinlerden bazıları aktin filamanlarının yeniden düzenlenmesine katkıda bulunur.



Şekil 11.30 Miyozin I
Miyozin I, miyozin II'ye benzer şekilde bir baş grubu içerir, fakat nispeten kısa bir kuyruğu vardır ve dimer ya da filaman yapıları oluşturmaz. Ayrıca bu molekül, kasılmayı indükleyemese de aktin filamanları boyunca artı uca doğru hareket eder ve kuyruğuna tutunan zar vezikülleri gibi çeşitli kargoları taşır.



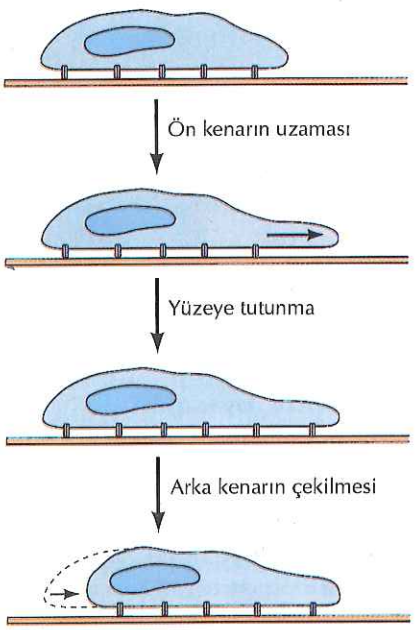
Şekil 11.31 Miyozin V
Miyozin V Miyozin II gibi iki başlı miyozindir. Organel ve ara filamanlar gibi yapıları aktin filamanlarının artı uçlarına doğru taşır. Şekilde verilen model X-ışını kristallografisi verilerine dayanarak elde edilmiştir. (R.D. Vale, 2003. *Cell* 112:467)

Hücre Göçü ve Sürünme Hareketi

Hücrenin bir yüzeyde ilerlemesi, basit tipte bir hücre hareketlidir ve çok sayıda farklı hücre tarafından kullanılır. Örnek olarak, amiplerin sürünme hareketi, gelişim sırasında embriyo hücrelerinin göçü, enfeksiyonlarla savaş sırasında beyaz kan hücrelerinin dokulara invazyonu, yara iyileşmesine katılan hücrelerin göçü ve malin tümörlerin metastazı sırasında kanser hücrelerinin yayılması verilebilir. Benzer hareket tipleri, fagositozdan ve sinir sisteminin gelişimi sırasında gerçekleşen sinir hücresi uzantılarının uzamasından sorumludur. Bu hareketlerin hepsi aktin hücre iskeletinin dinamik özelliklerine dayansa da, mikrotübül ve ara filamanlar ile de ilişkilidir. Hücre iskeleti düzeyindeki ayrıntılı mekanizma ve hücre dışından gelen sinyallere yanıt olarak regülasyonu (Bölüm 13'de anlatılmıştır) tam olarak anlaşılamamıştır.

Hücre göçü ve sürünme hareketi üç aşamada incelenebilecek koordine bir hareketler döngüsüdür. İlk olarak, hücrenin öncü kenarından psödopod, lamellipod ya da filopod gibi (bkz. Şekil 11.18) çıkıntılar uzamalıdır (Şekil 11.32). İkincisi, bu uzantılar hücrenin göç edeceği yüzeye tutunmalıdır. Sonunda, hücrenin arka kenarı yüzeyden ayrılmalı ve hücre gövdesine doğru geri çekilmelidir. Öncü kenarın uzaması için aktin filamanlarının dallanması ve polimerleşmesinin gerekli olduğunu gösteren birçok deney vardır. Örneğin, aktin polimerleşmesinin engellenmesi (örn., sitokalasin uygulanması ile) hücre yüzey çıkıntılarının oluşmasını bloklamaktadır.

In vivo hücre hareketleri en iyi, kesilen uçlardaki hücrelerin hücre dışı matrise veya yarayı kaplayan alttaki hücrelere doğru hareket ettikleri, yara iyileşmesinde anlaşılmıştır. Bu sürece, Bölüm 13'de anlatıldığı gibi, Rho ailesindeki küçük GTP-bağlayan proteinler de katılır. Rho proteinleri bölgesel aktin filamanlarının büyümesini ve dallanmasını başlatır. Bunu yeni dallar oluşturacak Arp 2/3 kompleksini ve eski filamanları ikiye bölecek ADF/kofilini aktive ederek ve yeni artı uçlardan yeni filamanların uzamasını sağlayarak gerçekleştirir. Mikrofilamanlar büyüyen hücre uzantısının içine doğru uzayınca, yeniden düzenlenmiş mikrotübüller ve yeni mikrofilamanlar, genişlemenin devam etmesi için gerekli zar veziküllerinin ve proteinlerin taşınması için gerekli yolları oluşturur. Bu kargo proteinlerinin arasında, öncü kenarın hemen arkasında aktin demetlerinin ve stres liflerinin oluşması için gerekli aktin-demetleyici



Şekil 11.32 Hücre göçü
Hücrenin belli bir yüzey üzerinde hareketi birbiri ile bağlantılı üç evreden oluşmaktadır: (1) ön kenarın ileriye doğru uzaması, (2) yine ön kenarın yüzeye tutunması, (3) hücrenin arka kenarının ana gövdeye doğru çekilmesi

proteinler, kalponin ailesi proteinler, fokal adezyonlarda bulunan talin ve vinkulin gibi proteinler (bkz. Şekil 11.14) ve öncü uçta Arp 2/3 kompleksini zara bağlayan zar ile bağlantılı bir protein olan kontaktin sayılabilir. Ara filaman proteinleri de ön kenara doğru taşınırlar, burada ara filaman ağının yeniden düzenlenmesinde kullanılırlar. Hem kinezin hem de miyozin motorları bu sürece katılır. Sinir hücrelerinde, filopodların oluşmasında, yeni zar bileşenlerini sağlamak için, sıra dışı bir miyozin olan miyozin V gereklidir.

Hücrelerin yüzeye tutunması için hücre-yüzey ya da hücre-hücre adezyonunun yeniden yapılanması gereklidir. Epitel hücreleri ya da fibroblastlar gibi yavaş hareket eden hücrelerde tutunma için fokal adezyonların oluşması gerekir (bkz. Şekil 11.14). Amipler veya beyaz kan hücreleri gibi daha hızlı hareket eden hücreler ise, yüzey ile moleküler içeriği henüz bilinmeyen daha yoğun temas oluştururlar. Fokal adezyonların yeniden yapılanması iki basamakta oluşur. İntegrin proteinleri ile bağlantılı birkaç filaman içeren küçük fokal komplekslerin görülmeye başlanması ve bu fokal komplekslerden, olgun fokal kontaktların gelişimi (Şekil 11.14'de görüldüğü gibi). Hücre ve yüzey arasında gerilimin oluşması için olgun fokal temasların görülmesi gereklidir, bu da aktin demetleri ya da stres lifleri üzerinde etkili miyozin motorları tarafından oluşturulur.

Hücre göçünde son basamak, ARF ailesi küçük GTP-bağlayan proteinlerin etkisi ile gerçekleşen (bkz. Bölüm 9) arka kenarın geri çekilmesidir. Bu olay hücrenin arka kenarındaki fokal adezyonların bozulmasını gerektirir. Hücrenin ön kenarındaki yeni fokal adezyonlarla bağlantılı aktin demetlerinin ve stres liflerinin kasılması, hücrenin arka ucunu ileriye çekmesi için gerekli gücü oluşturur. Arka ucun geri çekilmesi için Miyozin II'ye ihtiyaç olduğu ilk kez *Dictyostelium*'un Miyozin II eksikliği olan mutantlarında gösterilmiştir, fakat şimdi tüm ökaryot hücrelerde bilinmektedir.

Ara Filamanlar

Ara filamanlar 10 nm çapındadır, bu boyut hücre iskeletinin diğer iki temel elemanı olan aktin filamanları (yaklaşık 7 nm) ve mikrotübüller (yaklaşık 25 nm) çaplarının arasındadır. Aktin filamanları ve mikrotübüllerin tersine ara filamanlar hücre hareketlerine doğrudan katılmazlar. Bunun yerine hücre ve dokulara mekanik güç sağlayarak yapısal rol oynarlar.

Ara Filaman Proteinleri

Her ne kadar, aktin filamanları ve mikrotübüller tek tip proteinlerin polimerleri ise de, ara filamanlar farklı hücre tiplerinde eksprese edilen birçok protein çeşidinden oluşmuşlardır. Elliden fazla farklı ara filaman tipi tanımlanmıştır ve amino asid dizileri arasındaki benzerliklere göre altı grupta sınıflandırılmışlardır (Tablo 11.1). Tip I ve II, epitel hücrelerde eksprese edilen, her biri yaklaşık 15 farklı protein içeren iki **keratin** grubundan oluşmuştur. Her

TABLO 11.1 Ara Filaman Proteinleri

Tip	Protein	Boyut (kd)	Eksprese Edildiği Yer
I	Asidik keratinler (~ 15 protein)	40-60	Epitel hücreler
II	Nötral ya da bazik keratinler (~ 15 protein)	50-70	Epitel hücreler
III	Vimentin	54	Fibroblastlar, beyaz kan hücreleri ve diğer hücre tipleri
	Desmin	53	Kas hücreleri
	Glial fibriler asidik protein	51	Glial hücreler
	Periferin	57	Periferal sinir hücreleri
IV	Nörofilaman proteinleri		
	NF-L	67	Sinir hücreleri
	NF-M	150	Sinir hücreleri
	NF-H	200	Sinir hücreleri
	α-interneksin	66	Sinir hücreleri
V	Nükleer laminler	60-75	Tüm hücre tiplerindeki nükleer lamina
VI	Nestin	200	Merkezi sinir sisteminin kök hücreleri

epitel hücre tipi, filamanlar halinde birlikte polimerleşen en azından bir tip I (asidik) ve bir tip II (nötral/bazik) keratin sentezler. Keratin tip I ve II nin bazı tipleri (**sert keratinler**) kıl, tırnak ve boynuz gibi yapıların üretilmesinde kullanılır. Keratin tip I ve II'nin bazı diğer tipleri (**yumuşak keratinler**) epitel hücrelerin sitoplazmalarında yoğun olarak bulunur ve çeşitli farklılaşmış hücre tiplerinde, farklı keratinler eksprese edilir.

Tip III ara filaman proteinleri, fibroblastları, düz kas hücrelerini ve bayaz kan hücrelerini de içeren birçok farklı çeşit hücrede bulunan bir protein olan **vimentin** içerir. Aktin filamanlarından farklı olarak, vimentin hücre çekirdeğinden hücre dış kenarına doğru uzayan bir ağ yapısı oluşturur. Bir diğer tip III proteini olan **desmin** özgün olarak kas hücrelerinde eksprese edilir ve buradaki farklı kasılabilir elemanları Z diskine bağlar. Üçüncü, tip III ara filaman proteini, spesifik olarak glial hücrelerde eksprese olur ve dördüncüsü ise periferal sinir sistemindeki nöronlarda üretilir.

Tip IV ara filaman proteinleri, üç **nörofilaman (NF) proteinini** (sırasıyla hafif, orta ve ağır olarak tanımlanan NF-L, NF-M ve NF-H) içerir. Bu proteinler bir çok tipteki olgun sinir hücrelerinde ana ara filamanları oluşturur. Özellikle, motor nöronların aksonlarında yoğun olarak bulunurlar ve boyu bir metreden daha fazla uzayabilen bu ince, uzun yapılara destek sağlayarak önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Bir diğer, tip IV proteini olan α-interneksin nöral gelişimin erken dönemlerinde, nörofilaman proteinlerinin ekspresyonundan önce eksprese edilir. Tek tip VI ara filaman proteini (~~netsin~~) nöral gelişimin daha da erken dönemleri sırasında, merkezi sinir sistemi kök hücrelerinde eksprese edilir.

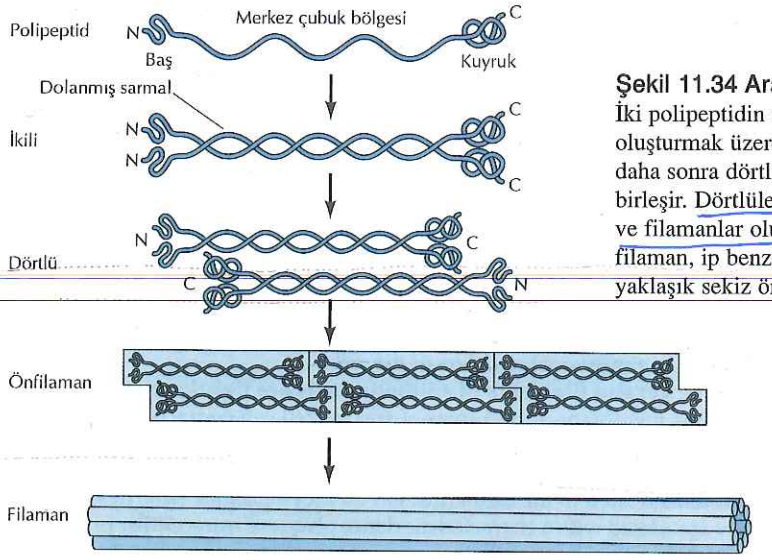
Tip V ara filaman proteinleri, çoğu ökaryot hücrede bulunan nükleer laminlerdir. Nükleer laminler, hücre iskeletinin bir parçası olmalarından çok, nükleus zarının altını döşeyen ortogonal bir tabaka oluşturacak şekilde yapılanan ve nükleusa çok yoğun olarak dağılan bir nükleus bileşenidir (bkz Şekil 8.3).

Boyut ve amino asid dizilerindeki önemli farklılıklara rağmen, farklı ara filaman proteinlerinin yapısal organizasyonu aynıdır (Şekil 11.33). Ara filaman proteinlerinin hepsinde, yaklaşık 310 amino asit uzunluğunda merkezi bir α-sarmal çubuk bölgesi vardır (nükleer laminlarde 350 amino asit). Bu merkezi çubuk bölgesinin iki ucu amino ve karboksi uç bölgeleri ile çevrelenmiştir. Bu bölümlerde farklı ara filaman proteinlerinde boyut, dizi ve ikincil yapı değişkenlikleri vardır. Daha sonra da bahsedileceği gibi, α-sarmal çubuk bölgesi, filaman yapılanmasında temel rol oynar, değişik baş ve kuyruk bölümlerinin farklı ara filamanların özgün işlevlerinin belirlenmesinde önemli olduğu tahmin edilmektedir.

Ara Filamanların Yapılanması

Filaman yapılanmasında birinci basamak ikili yapının oluşmasıdır. Bunun için miyozin II ağır zincirlerindekine benzer bir şekilde, iki polipeptid zincirinin merkezi çubuk bölgeleri dönen sarmal yapısında

Şekil 11.33 Ara filaman proteinlerinin yapısı
Ara filaman proteinleri yaklaşık 310 amino asitlik (nükleer laminlerde 350 amino asit) merkezi α-sarmal çubuk bölgesi içermektedir. N-ucu baş ve C-ucu kuyruk bölgeleri, boyut ve şekil bakımından çeşitlilik göstermektedir.



Şekil 11.34 Ara filamanların yapılanması
İki polipeptidin merkezi çubuk bölgeleri ikili yapı oluşturmak üzere birbiri etrafında kıvrılarak döner. İkililer daha sonra dörtlü yapı oluşturmak üzere zıt-paralel olarak birleşir. Dörtlüler ise önfilamanları oluşturmak üzere uç uca ve filamanlar oluşturmak üzere yan yana bağlanır. Her bir filaman, ip benzeri bir yapı şeklinde birbirine dolanmış olan yaklaşık sekiz önfilaman içermektedir.

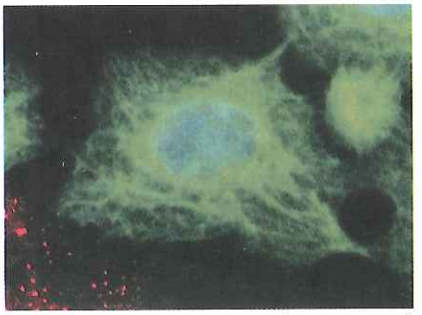
birbirlerinin etrafına sarılır (Şekil 11.34). Daha sonra ikililer kaymış zıt-paralel şekilde bağlanarak dörtlüleri oluştururlar, bunların uç uca bağlanması ile önfilamanlar meydana gelir. Sonuçta elde edilen ara filaman birbiri üzerinde dönerek ip benzeri bir yapı oluşturmuş yaklaşık sekiz önfilaman içerir. Bunlar antiparalel tetramerler halinde yapılandıkları için, ara filamanların her iki ucu da aynıdır. Aktin filamanlarının ve mikrotübüllerin aksine ara filamanlar apolardır, farklı artı ve eksi uçları yoktur.

Filaman yapılanması için ara filaman proteinlerinin özgün tipleri arasındaki etkileşimler gereklidir. Örneğin, keratin filamanları daima bir tip I ve bir tip II polipeptidden oluşan heterodimerler şeklinde yapılanır. Bunun tersine, tip III proteinleri yalnızca tek bir polipeptid (örn., vimentin) veya iki farklı tip III protein (örn., vimentin ve desmin) içeren filamanlar halinde yapılanabilir. Bununla birlikte, tip III proteinleri keratinler ile birlikte polimer oluşturmaz. Tip IV proteinlerinden α-interneksin kendi kendisi ile filamanlar oluşturacak şeklide yapılanabilirken, üç nörofilaman proteini heteropolimerler oluşturacak şekilde birlikte polimerleşebilir.

Ara filamanlar genellikle aktin filamanlarından veya mikrotübüllerden daha kararlıdır ve hücre iskeletinin bu gibi diğer elemanları ile bağlanarak, dinamik davranışlar sergilemez (örn., Şekil 11.14'de şematize edilen aktin filamanlarının yürümesi). Bununla birlikte, ara filaman proteinleri sıklıkla, fosforillenerek modifiye edilebilir, bu da onların hücre içinde yapılanmalarını ya da ayrışmalarını düzenleyebilir. Bir örnek olarak, mitoz sırasında nükleer laminanın ayrışması ve nükleer zarfın yıkılması ile sonuçlanan nükleer laminlerin fosforillenmesi verilebilir (bkz. Şekil 8.31). Sitoplazmadaki vimentin gibi ara filamanlar da fosforillenir. Bu fosforilasyon bölünen veya göç eden hücrelerde ara filamanların ayrışmasına ve yeniden düzenlenmesine öncülük edebilir.

Ara Filamanların Hücre İçi Düzenlenmesi

Ara filamanlar, çoğu hücrenin sitoplazmasında, çekirdeği çevreleyen bir halkadan plazma zarına kadar yayılan özenli bir ağ yapısı oluşturur



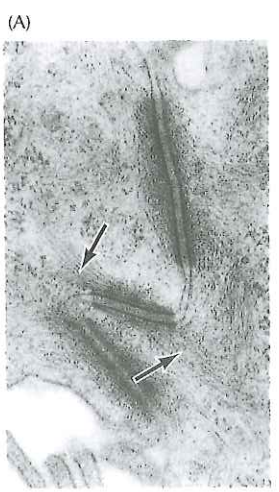
Şekil 11.35 Keratin filamanlarının hücre içi düzeni
Keratine (yeşil) spesifik fluoresan antikorlar ile boyalı epitel hücresi mikroskop görüntüsü. Nukleus mavi boyalıdır. Keratin filamanları nukleusu saran bir halka yapısından plazma zarına doğru uzamaktadır. (Nancy Kedersha/Immunogen/Photo Researchers, Inc.)

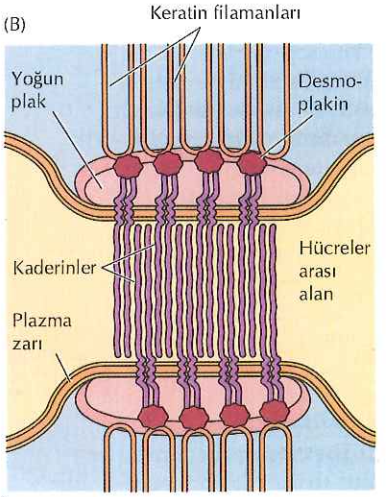
(Şekil 11.35). Hem keratin hem de vimentin filamanları nükleer zarfa tutunur, nükleusu hücre içinde tutar ve bir yerleşim sağlar. Ek olarak, ara filamanlar yalnızca plazma zarı ile değil, hücre iskeletinin aktin filamanları ve mikrotübüller gibi diğer elemanları ile de bağlanır. Bu yüzden ara filamanlar hücre iskeleti elemanlarını bir arada tutan ve hücrenin iç yapısını düzenleyen bir dayanak oluşturur.

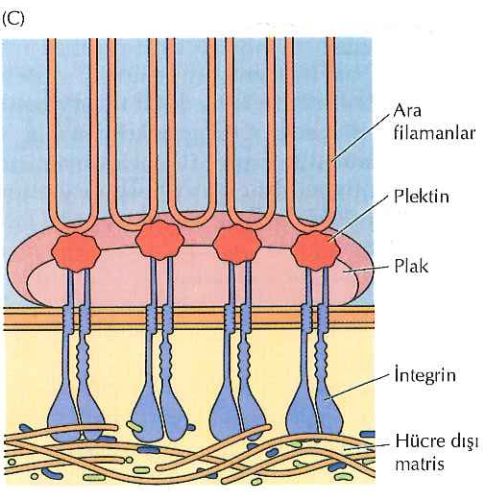
Epitelyal hücrelerdeki keratin filamanları, plazma zarlarına **desmozom** ve **hemidesmozom** denilen iki özelleşmiş hücre dokunma bölgesinden sıkıca tutunmuşlardır (Şekil 11.36). Desmozomlar komşu hücreler arasındaki bağlantılardır ve bu hücre-hücre bağlantıları kaderinler ile ilişkili transmembran proteinler aracılığıyla düzenlenir. Desmozomlar, sitoplazmadaki bölümleri ile, keratin filamanlarının da tutunduğu tipik bir hücre içi protein plağı ile bağlantılıdır. Bu bağlanma, ara filamanlara bağlanarak onları diğer hücresel yapılar ile ilişkilendiren ve **plakin** adındaki protein ailesinin bir üyesi olan desmoplakin aracılığı ile gerçekleşir. Hemidesmozomlar epitel hücreler ve altındaki bağ dokusu arasındaki morfolojik olarak benzer bağlantılardır. Bu bağlantılarda keratin filamanları plakin ailesinin farklı üyeleri (örn., plektin) aracılığıyla integrinlere bağlanmıştır. Bu nedenle, desmozomlar ve hemidesmozomlar ara filamanları sırasıyla hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantı bölgelerinde tutar, bu, aktin hücre iskeletinin aterens bağlantı ve fokal adezyonlarda plazma zarına tutunmasındakine benzerdir. Desmozomların her iki ucuna tutunan keratin filamanlarının, epitel hücre tabakasındaki komşu hücreler arasında bir mekanik bağlantı oluşturması, böylece tüm dokunun mekanik kararlılığının sağlaması önemlidir.

Ara filamanları hücre bağlantı bölgelerine bağlamalarına ek olarak, bazı plakinler ara filamanları hücre iskeletinin diğer elemanlarına bağlar. Örneğin plektin, ara filamanlara bağlanmasının yanı sıra aktin filamanlarına ve mikrotübüllere de bağlanır, böylece bu hücre iskeleti

Şekil 11.36 Ara filamanların desmozom ve hemidesmozomlara tutunması
(A) Keratin filamanlarını (oklar) desmozomun her iki tarafındaki, protein içeren yoğun hücre içi plaklara tutulu halde gösteren elektron mikrografı. (B) Desmozomun şematize hali. Ara filamanlar desmoplakinler aracılığıyla hücre-hücre adezyon noktalarına tutunurlar. (C) Hemidesmozomun şematize hali. Ara filamanlar plektin aracılığıyla integrine tutunurlar. (A, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)

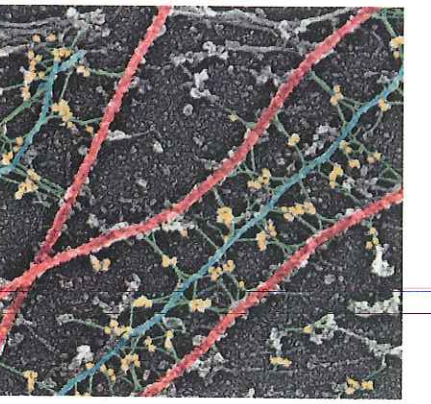






elemanları arasında köprüler oluşturur (Şekil 11.37). Ara filamanlarla bağlantının aktin filamanları ve mikrotübüllere destek sağladığı ve sabitlediği, böylece hücrenin mekanik kararlılığını artırdığı düşünülmektedir.

Ara filaman tiplerinden ikisi, desmin ve nörofilamanlar, sırasıyla kas ve sinir hücrelerinde özelleşmiş roller oynarlar. Desmin kas hücrelerindeki aktin-miyozin gruplarını hem birbirlerine hem de plazma zarına bağlar, böylece tek tek kasılabilir elemanların etkilerini birleştirir. Nörofilamanlar, çoğu olgun sinir hücresinde bulunan temel ara filamanlardır. Özellikle motor nöronların aksonlarında bol miktarda bulunurlar, bu bölge, plakin ailesinin nöronal üyeleri aracılığı ile, aktin filamanlarına ve mikrotübüllere tutundukları yer olarak görülmektedir. Sinir hücrelerinin bu uzun, ince uzantılarında nörofilamanların, mekanik destek sağlayarak ve hücre iskeletinin diğer elemanlarını sağlamlaştırarak önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

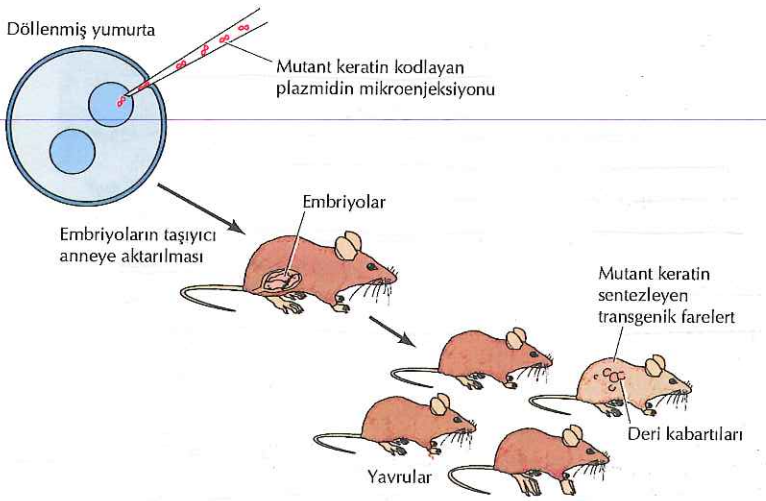


Şekil 11.37 Ara filamanlar ve mikrotübüller arasında bulunan plektin köprülerine ait elektron mikroskop görüntüsü
Plektine özgül antikor ile boyalı fibroblasta ait elektron mikrografı. Mikrograf plektin (yeşil), plektine spesifik antikorlar (sarı), ara filamanlar (mavi) ve mikrotübülleri (kırmızı) göstermek amacıyla yapay olarak renklendirilmiştir. (Tatyana Svitkana ve Gary Borisy'nin izniyle, University of Wisconsin, Madison)

Keratin ve Nörofilamanların Fonksiyonları: Deri ve Sinir Sistemi Hastalıkları

Uzunca bir süre, ara filamanların hücrelere yapısal destek sağladığı düşünülmüş ise de, gerçek fonksiyonlarını gösteren direkt kanıtlar son zamanlarda elde edilmiştir. Kültür koşullarındaki bazı hücrelerin ara filaman proteinleri sentezlememesi, bu proteinlerin hücrelerin *in vitro* çoğalmaları için gerekli olmadığını gösterir. Benzer bir şekilde, kültürdeki hücrelere vimentine karşı antikorların enjeksiyonu, hücre bölünmesini ve hareketlerini etkilemeksizin, ara filaman ağını tahrip eder. Bundan dolayı, ara filamanların çok hücreli organizmaların dokularındaki hücrelerin hücre iskeletlerini güçlendirmek için gerekli olduğu düşünülmektedir, hücrelere uygulanan mekanik stresler kültür kabındaki izole çevresel koşullardaki hücreleri etkilememektedir.

Ara filamanların *in vivo* rolünü gösteren deneysel kanıtlar ilk olarak 1992'de Elaine Fuchs'un laboratuarındaki çalışmalar ile elde edildi. Bu araştırmacılar, normal keratin filaman oluşumunu bozan kısa bir polipeptid kodlayan bir keratin delesyon mutantının ekspresyonunun *in vivo* etkilerini araştırmak için, transgenik fare modelleri kullandılar (Şekil 11.38) Bu mutant keratin geni, önce transgenik farelere aktarıldı, epidermisin bazal hücrelerinde eksprese edildi ve normal



Şekil 11.38 Keratin fonksiyonunun deneysel gösterimi
Keratin filamanlarının normal birleşmesini bozan, mutant keratini kodlayan plazmid, döllenmiş yumurtanın pronükleusuna mikroenjekte edilir. Mikroenjekte embriyolar daha sonra anneye aktarılır ve bazı yavruların mutant keratin genini kendi genomlarına dahil ettiği gözlenir. Bu transgenik farelerdeki mutant genin ekspresyonu epidermis hücrelerindeki keratin hücre iskeletini bozmakta ve hafif mekanik stres varlığında deride hücre erimesine bağlı şiddetli kabarmalara yol açmaktadır.

ANAHTAR DENEY

Mutant Keratin Ekspresyonu Anormal Deri Gelişimine Neden Olur

Mutant Keratin Expression in Transgenic Mice Causes Marked Abnormalities Resembling a Human Genetic Skin Disease

Robert Vassar, Pierre A. Coulombe, Linda Degenstein, Kathryn Albers, and Elaine Fuchs
University of Chicago

Cell, 1991, Volume 64, pages 365-380

Elanie Fuchs

Bağlam

1991 yılında, epitelyal hücrelerde ara filamanlar iyi bilinmekteydi ve deride tip 1 ve 2 keratinin farklı formlarının, gelişimsel süreçteki görünümleri çalışılmaktaydı. Ara filamanlar hakkında bilinmeyen ise fonksiyonlarıydı. Bütün omurgalı hücrelerinde ara filamanlar bulunurken, onları içermeyen hücre dizileri kültürde yaşamlarını devam ettirebilmekte ve çoğalabilmektedir. Bundan dolayı, ara filamanların fonksiyonları her ne ise, kültürdeki hücreler için değil, olasılıkla çok hücreli organizmaların dokularındaki hücreler için önemliydiler.

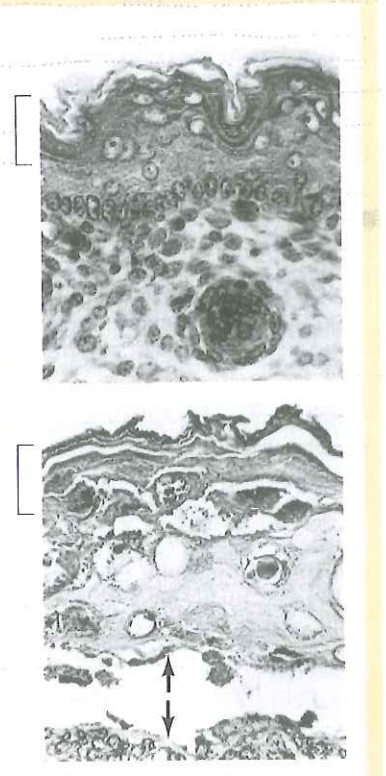
Fuchs ve arkadaşları, erken gelişim sırasında deri epitelinin keratin 5 (tip I) ve keratin 14 (tip II) eksprese ettiğini bilmekteydiler. Keratinler heterodimer olarak polimerize olduklarından anormal bir proteinin ekspresyonunun normal ara flamanların oluşumunu olumsuz etkileyebileceği düşünüldü. Fuchs ve arkadaşları bu olasılığı önce kültürdeki deri hücrelerinde test ettiler ve kesilmiş kısa keratin 14 ekspresyonunun keratin filaman oluşumunu bozduğunu gösterdiler. Bu da, mutant keratinin aynı şekilde transgenik farelerde ekspresyonunun, embriyonun deri hücrelerinde ara filaman ağında hatalara neden olabileceğini düşündürdü. Bu yapılabilirse, normal dokulardaki ara filamanların rolünün incelenmesi gerçekleştirilebilirdi.

Burada tanımlanan deneyde, Fuchs ve arkadaşları transgenik farelerde mutant keratin ekspresyonunun sadece deri hücrelerindeki ara filaman ağını bozmadığını, bunun yanı sıra deride ciddi organizasyon ve doku stabilitesi bozukluklarına yol açtığını gösterdiler. Bu şekilde, bu deneylerle ara filamanların fizyolojik rolünün ilk kez gösterilmesi sağlandı.

Deneyler

Kültür hücrelerinde gerçekleştirilen ilk deneylerde, Fuchs ve arkadaşları, normal keratin promotörü üzerinden α-sarmal bölgenin %30'unun ve karboksi ucundaki kuyruğun tamamının eksik olduğu kesilmiş kısa bir proteinin eksprese olduğu, mutant keratin 14 genini oluşturdular. Erken fare gelişiminde keratin 14'ün rolünü araştırmak amacıyla, bu mutant keratin 14'ü taşıyan plazmidi, döllenmiş fare yumurtalarına verdiler ve dişi farelere aktararak yavru oluşumunu gerçekleştirdiler. Bütün yavrular keratin 14 açısından incelendi ve bazılarının transgenik olup, mutant keratin 14 proteinini eksprese ettiğini gördüler.

Transgenik farelerin çoğu doğumdan sonraki 24 saat içerisinde öldüler. Daha uzun süre yaşayanlar, deri sürtünmesi gibi hafif şiddetli mekanik travma sonrasında gelişen, epidermal hücre erimesine bağlı kabarcıklar dahil olmak üzere ciddi deri bozuklukları gösterdiler. Transgenik farelerden elde edilen deriye ait boyalı doku kesitlerinin analizinde, en çok etkilenen hayvanların epidermisinde şiddetli (bkz şekil), diğer hayvanlarda ise bölgesel olarak organizasyon bozuklukları gözlendi. Bölgesel ekspresyon, mozaik hayvanın bir özelliği olup bazı dokular normal embriyo hücrelerinden, bazıları ise transgeni taşıyan hücrelerden köken almaktadır. Mutant proteinin analizi sırasında organizasyon bozukluğu



Normal ve transgenik fareden elde edilen deri örneği. Normal fareden elde edilen örnekte (üstte) altında bulunan doku ile arasında boşluk içermeyen oldukça iyi organize olmuş dış tabaka görülmektedir (köşeli parantez). Transgenik fareden elde edilen deri örneğinde ise (altta) mekanik travmaya bağlı olarak boşluklar içeren dış tabakada ciddi bozulma ve altındaki dokudan ayrılma gözlenmektedir (oklar).

görülen dokular ile mutant keratin 14 ekspresyonunun ilişkili olduğunu gördüler. Bunun yanı sıra, organizasyon bozukluğu gözlenen epidermis miktarı ile doğumdaki travma sırasında doku hasarı ve ölüme yatkınlık arasında net bir korelasyon bulunmaktaydı.

Fuchs ve arkadaşları, daha sonra transgenik farelerde gözlenen doku organizasyon bozukluğu paterninin epidermolizis bulloza simpleks adı verilen insan deri hastalığına benzer olduğunu gözlediler. Bu nedenle, transgenik fare kesitleri ile hastadan elde edilen kesitleri karşılaştırdıklarında, doku hasarında çok büyük benzerlikler buldular. Buna dayanarak, keratin ya da ara filaman ilişkili proteinlerdeki hasarın insanlarda deride genetik bir hastalığa neden olabileceğini bildirdiler.

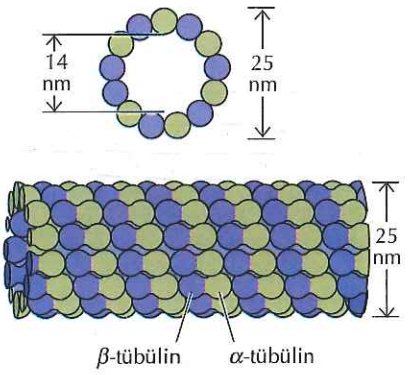
Etki

Transgenik farelerde saptanan doku bozuklukları, keratinlerin dokulardaki epitelyal hücrelerin mekanik dayanıklılığını sağladığına yönelik olası rollerine doğrudan destek sağlayan ilk kanıttır. Artık, ara filaman hücre iskeletinin, mekanik stresle karşı karşıya kalan ince barsak, kalp ve iskelet kası gibi dokuların yapısı için önemli olduğu bilinmektedir. Bunun aksine, maya gibi tek hücreli ökaryotlar ve birçok küçük omurgasız canlı, ara filamanları olmaksızın, yapısal destek için aktin veya tubulin hücre iskeletini genellikle modifiye ederek, yaşamlarını mükemmel bir şekilde devam ettirebilmektedir. Fuchs ve arkadaşlarının sonuçları aynı zamanda bazı insan hastalıkları için bir temel oluşturmuştur. Günümüzde, insan hastalıklarında kusurlu olduğu bilinen, başlangıçta transgenik farelerde çalışılan keratin 5 ve keratin 14 de dahil, 17'den fazla farklı keratin bulunduğu bilinmektedir.

keratin hücre iskeletinin oluşumu bozuldu. Bu derinin sürtünmesi gibi orta şiddetteki mekanik travmaları takiben oluşan epidermal hücre kaybı, kabarcıkları içeren çok şiddetli deri anomalilerinin gelişmesi ile sonuçlandı. Böylece, bu transgenik hayvanlardaki deri anomalileri, keratinlerin rolünün, dokulardaki epitel hücrelerinin mekanik gücünü sağlamak olduğu öngörüsüne direkt destek sağladı. Daha sonra, farelerde aynı keratin geninin homolog rekombinasyon ile inaktive edilmesinin de aynı şeklide sonuçlandığı gösterildi.

Bu deneyler epidermolizis bulloza simpleks (EBS) denilen bir insan genetik hastalığının moleküler temelini de gösterdi. Mutant keratin genini eksprese eden transgenik fareler gibi, bu hastalarda da küçük travmalar sonrasında oluşan hücre erimesinin sonucunda deride kabarcıklar gelişmektedir. Bu benzerlik, EBS'li hastalarda keratin geninin çalışmalarını başlattı, bu da EBS'ya neden olan ve keratin genlerinin normal yapılanmasını engelleyen keratin gen mutasyonlarının gösterilmesine öncülük etti. Böylece, hem transgenik hayvanlardaki deneysel çalışmalar, hem de bir insan genetik hastalığının moleküler analizi çalışmaları, keratinin mekanik stres altındaki deri hücrelerindeki rolünü gösterdi. Süregelen çalışmalar, epidermal hücrelerde dayanıklılık bozuklukları ile karakterize diğer birçok kalıtsal deri hastalığından diğer keratin tiplerindeki mutasyonların sorumlu olduğunu göstermektedir.

Transgenik hayvanlardaki diğer çalışmalar, motor nöron hastalıklarında, özellikle amiyotrofik lateral skleroz (ALS)'da, nörofilamanlarda bozukluklar olduğunu gösterdi. Lou Gehrig hastalığı olarak bilinen ve ünlü fizikci Stephan Hawking'i de etkileyen hastalık olan ALS, motor nöronların ilerleyen kaybı ile sonuçlanır. Bu kayıp kas zayıflığı, felç ve sonuçta ölüme yol açar. ALS ve diğer tipteki motor nöron hastalıkları, nörofilamanların birikiminde ve yapılanmasında bozukluklar ile karakterize edilir, bu da nörofilaman bozukluklarının bu patolojilere katılıyor olabileceğini düşündürmektedir. Transgenik farelerde NF-L ve NF-H fazla üretiminin ALS'a benzer durumun gelişmesi ile sonuçlanması da, bu olasılık ile uyumludur. Mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, bu deneyler motor nöron hastalıklarında nörofilamanların rolünü açıkça desteklemektedir.



Şekil 11.39 Mikrotübüllerin yapısı
Alfa ve β-tübülin dimerleri polimerleşerek mikrotübülleri oluşturur. Mikrotübüller ise ortası boş bir yapının etrafını saran 13 önfilaman yapısının birleşmesiyle meydana gelir.

Mikrotübüller

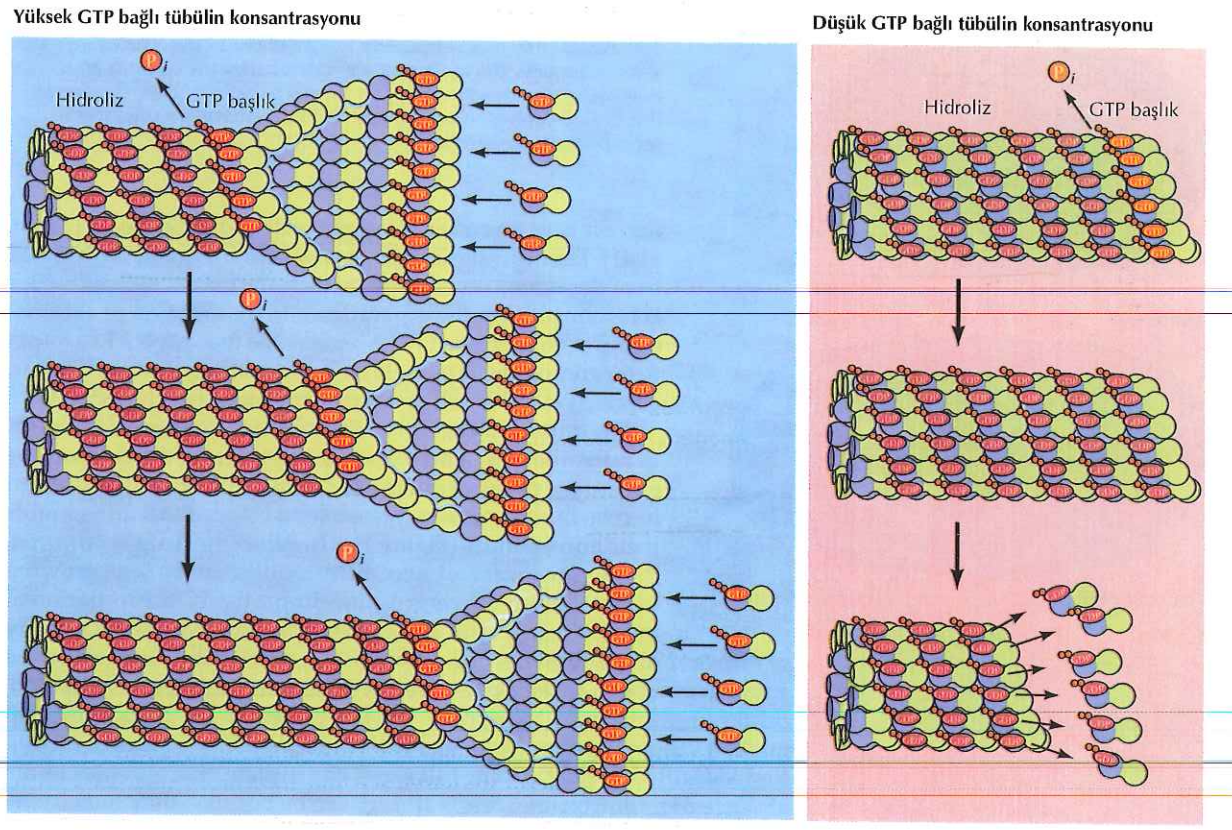
Üçüncü temel hücre iskeleti elemanı olan **mikrotübüller** yaklaşık 25 nm çapındaki sert, içi boş çubuklardır. Aktin filamanları gibi, mikrotübüller de hücre içinde devamlı yapılanıp ayrışabilen dinamik yapılardır. Hem hücre şeklinin belirlenmesinde, hem de hücrelerin yer değiştirmesinin bazı tiplerini, organellerin hücre içindeki taşınmasını ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını da içeren çok çeşitli hücre hareketlerinde görevleri vardır.

Mikrotübüllerin Yapısı, Yapılanması ve Dinamik Kararsızlığı

Birçok farklı fibröz proteinden oluşan ara filamanların aksine, mikrotübüller **tübülin** denilen globuler bir proteinden oluşmuştur. Tübülin, birbiri ile çok benzer 55 kd luk iki polipeptidden, α-tübülin ve β-tübülin, oluşan bir dimerdir. Aktin gibi, α-tübülin ve β-tübülin birbiri ile ilintili küçük gen aileleri tarafından kodlanırlar. Ek olarak üçüncü bir tübülin tipi (γ-tübülin) spesifik olarak sentrozomda yer alır ve mikrotübül yapılanmasında (birazdan anlatılacak) kritik rol oynar. Bütün bu tübülinlerin evrimsel atasının, prokaryot proteini FtsZ'ye benzeyen bir protein olduğu düşünülmektedir.

Tübülin dimerlerinin polimerleşmesi ile, boru şeklinde bir kor etrafında yapılanmış, genelde 13 doğrusal önfilaman içeren mükrotübüller oluşur (Şekil 11.39). Tübülin dimerlerinin baş-kuyruk yönünde dizisilmesi ile oluşan önfilamanlar, paralel şekilde bir araya gelmişlerdir. Sonuçta, mikrotübüller (aktin filamanları gibi) iki farklı ucu olan polar moleküllerdir: hızla büyüyen bir artı uç ve yavaş büyüyen bir eksi uç. Bu polarite, aktin filamanlarının polaritesinin miyozin hareketinin yönünü belirlemesinde olduğu gibi, mikrotübül boyunca hareketin yönünü belirlemede önemlidir.

Tübülin dimerleri polimerleştikleri gibi ayrışabilirler de ve mikrotübüller hızlı bir yapılanma ve ayrışma döngüsüne girebilirler. Hem α - hem de β-tübülin, ATP bağlı aktinin polimerleşmesinin kontrolündeki rolü ile aynı işleve sahip, GTP'ye bağlanır. Genelde, β-tübüline bağlı GTP (α-tübüline bağlı alan değil) polimerleşme sırasında veya polimerleşmeden çok kısa bir süre sonra GDP'ye hidrolize olur. Bu GTP hidrolizi tübülinin komşu moleküllere bağlanma eğilimini zayıflatır, böylece ayrışmaya yardımcı olur ve mikrotübüllerin dinamik değişkenliğini sağlar. Aktin filamanları gibi (bkz. Şekil 11.4), mikrotübüller de yürüme hareketi yapar. Bu hareket GDP'ye bağlı tübülin moleküllerinin eksi uçtan sürekli kaybedilmesi ve aynı mikrotübülün artı ucuna GTP bağlı tübülin monomerlerinin eklenmesi ile gerçekleşen dinamik bir davranıştır. Mikrotübüllerde GTP hidrolizi **dinamik kararsızlık** olarak bilinen, her bir mikrotübülün uzama ve kısalma döngüleri arasında gidip-gelmesi olarak tanımlanan olay ile sonuçlanır (Şekil 11.40). Bir mikrorubülün uzayacağı ya da kısalacağı, kısmen, tübülin eklenme oranına karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenir. Yeni GTP-bağlı tübülin molekülleri, GTP'nin hidrolizinden daha hızla eklendikleri süresince, mikrotübülün



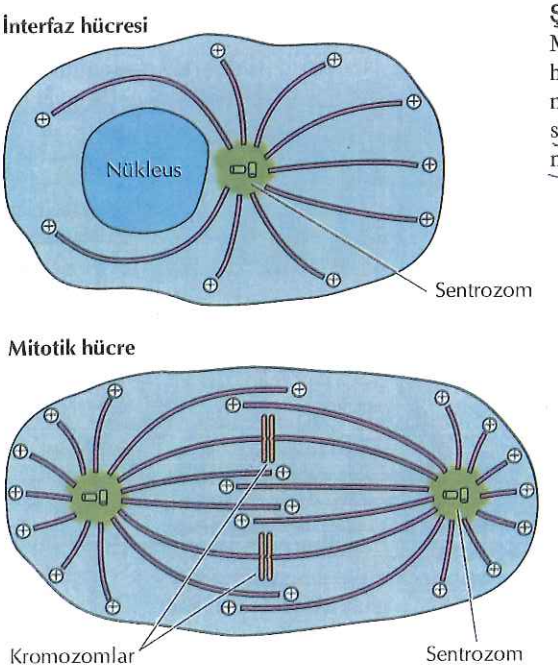
Şekil 11.40 Mikrotübüllerin dinamik kararsızlığı
Tubulin dimerleri mikrotübülün artı ucunda düz bir katman şeklinde polimerleşir ve daha sonra, olgun mikrotübülü oluşturmak üzere polimerleşme noktasının hemen arkasından fermuara benzer şekilde kapanır. Dinamik kararsızlık, polimerleşme sırasında ya da hemen sonrasında β-tübüline bağlı GTP'nin hidrolizinden kaynaklanır. Bu da onun komşu moleküllere bağlanma eğilimini azaltır. Mikrotübüllerin uzaması GTP'ye bağlı formda yüksek yogunlukda tübülin olduğu sürece devam eder. GTP-bağlı yeni tübülin molekülleri GTP'nin hidrolizinden daha hızlı eklenirler ve bu sayede uzayan uçta GTP başı korunmuş olur. Ancak eğer, GTP yeni alt birimlerin eklenmesinden daha hızlı hidrolize olursa, miktotübülün ucundaki GDP bağlı tübülinin varlığı, yapının çözülmesine yol açar.

artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Bununla birlikte, polimerleşme oranı yavaşsa, mikrotübülün artı ucundaki GTP bağlı tübülin GDP'ye hidrolize edilecektir. Bu olduğu zaman, GDP bağlı tübülin ayrışacak, hızlı depolimerizasyon ve kısalma ile sonuçlanacaktır.

İlk olarak 1984'de Tim Mitchison ve Marc Kirchner tarafından tanımlanan dinamik kararsızlık, çoğu mikrotübülün devamlı ve hızlı dönüşümü ile sonuçlanır. Hücre içindeki yarılanma süresi yalnızca birkaç dakikadır. Daha sonra da bahsedileceği gibi, mikrotübüllerin hızlı dönüşümü, özellikle mitoz sırasında gerçekleşen hücre iskeleti değişiklikleri için çok önemlidir. Mikrotübüllerin mitozdaki merkezi rolleri nedeniyle, mikrotübül yapılanmasını etkileyen ilaçlar, yalnızca hücre biyolojisi çalışmaları için deneysel bir araç olarak değil, kanser tedavisinde de yararlıdır. Sık kullanılan deneysel ilaçlara örnek olarak, tübüline bağlanana ve mikrotübül polimerleşmesini engelleyerek mitozu durduran **kolçisin** ve **kolsemid** verilebilir. İki benzer ilaç (**vinkristin** ve **vinblastin**), seçici olarak hızla bölünen hücreleri blokladığı için kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır. Yararlı bir diğer ilaç, **taksol** mikrotübüllerin yapılanmasını engellemek yerine stabilize eder. Bu kararlılık hücre bölünmesini de engeller, ve taksol deneysel kullanımı kadar antikanser ajan olarak kullanılır.

Sentrozom, Sentriyoller ve Mikrotübül Düzenlenmesi

Çoğu hücredeki mikrotübüller, eksi uçlarından tutundukları bir **mikrotübül düzenleyici merkez**den dışarıya doğru yayılır. Hayvan hücrelerinde, asıl mikrotübül düzenleyici merkez interfazdaki

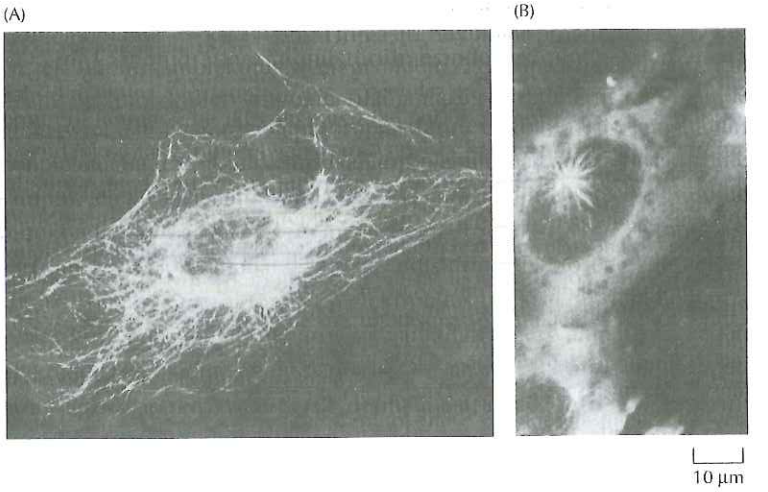


Şekil 11.41 Mikrotübüllerin hücre içi düzenlenmesi
Mikrotübüllerin eksi uçları sentrozomda tutuludur. Interfaz hücrelerinde sentrozom nükleus yakınlarında yerleşiktir ve mikrotübüller hücre çevresine doğru uzanmaktadır. Mitoz sırasında ise ikilenen sentrozomlar ayrılır ve mikrotübüller mitotik iği oluşturmak üzere yeniden düzenlenir.

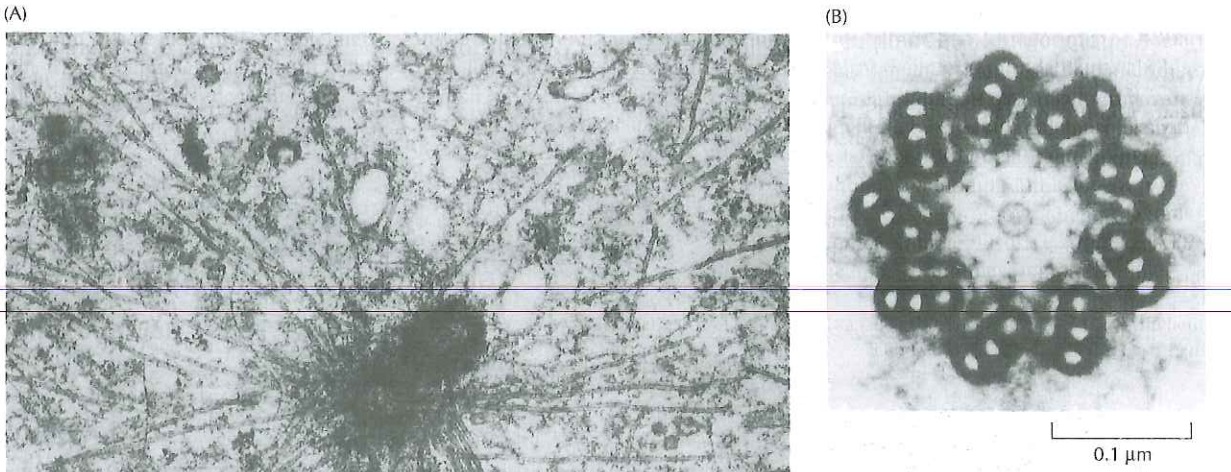
(bölünmeyen) hücrelerde, nükleusa komşu olarak, merkezde yerleşmiş olan **sentrozomdur** (ilk olarak 1888'de Theodore Boveri tarafından tanımlanmıştır) (Şekil 11.41). Mitoz sırasında mikrotübüller, kromozomların ayrılmasından ve yavru hücrelere dağılımından sorumlu mitotik iği oluşturmak üzere, kopyalanmış sentrozomlardan dışarıya doğru uzanır. Sentrozom bu nedenle mikrotübüllerin hücre içindeki düzenlerinin belirlenmesinde anahtar rol oynar. Ancak bu fonksiyonun birçok noktası henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

Sentrozom, sentrozomdan hücre kenarına doğru yayılan mikrotübüllerin yapılanması için bir başlangıç noktası olarak görev yapar. Bu, mikrotübüllerin yapılanması kolsemid ile engellenen hücrelerde açıkça görülebilir (Şekil 11.42). İlaç uzaklaştırıldığı zaman, hücreler eski haline döner ve sentrozomdan dışarıya doğru uzayan yeni mikrotübüller görülebilir. Mikrotübül uzamasının sentrozomdan başlaması, hücre içindeki mikrotübüllerin polaritesi için önemlidir. Genelde, mükrotübüller artı uçlarına tübülin eklenmesi ile, sentrozomdan dışarıya, hücre kenarına doğru uzarlar. Sentrozomdaki mikrotübüllerin yapılanmasından sorumlu anahtar protein, ilk olarak mantarlarda tanımlanmış, az rastlanan tübülin türü olan γ-tübülindir. Bazı hücre tipleri sentrozom olmadan mikrotübül yapılanmasını başlatabilirler. Bunun, bu hücrelerin sitozollerinde γ-tübülin bulunması nedeniyle gerçekleşebildiği düşünülmektedir. Ek olarak, interfazdaki hücreler ya da polarize epitel hücreleri veya sinir hücreleri gibi artık bölünmeyecek hücreler, mikrotübüllerini hücrenin her başka bölgelerinde işlev görmek üzere sentrozomdan ayrılırlar.

Çoğu hayvan hücresinin sentrozomu, birbirine dik yerleşmiş, amorf bir **sentriyol çevre maddesi** ile çevrelenmiş, bir çift **sentriyol** içerir (Şekil 11.43). Sentriyoller, dokuz adet üçerli mikrotübülden oluşan,



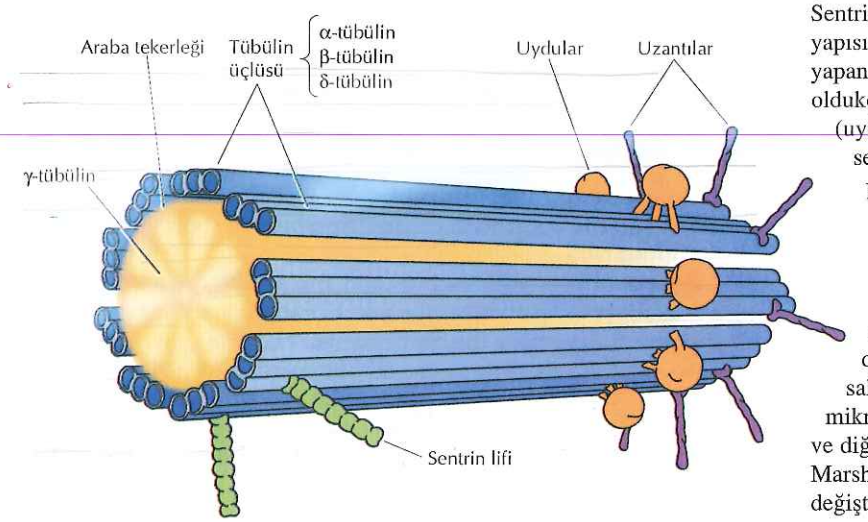
Şekil 11.42 Mikrotübüllerin sentrozomdan uzaması
Fare fibroblastlarındaki mikrotübüller, tübüline spesifik antikor kullanarak immünfloresans mikroskopi ile görüntülenmiştir. (A) Normal interfaz hücrelerinde mikrotübüllerin dağılımı (B) Bu hücre, mikrotübüllerin ayrışması için bir saat kolsemid ile muamele edilmiştir. Daha sonra ilaç uzaklaştırılmış, hücrenin eski haline dönmesi için 30 dakika beklenmiştir. Bu aşamada sentrozomdan uzayan yeni mikrotübüllerin görüntülenmesi sağlanmıştır. (M. Osborn and K. Weber, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73:867)



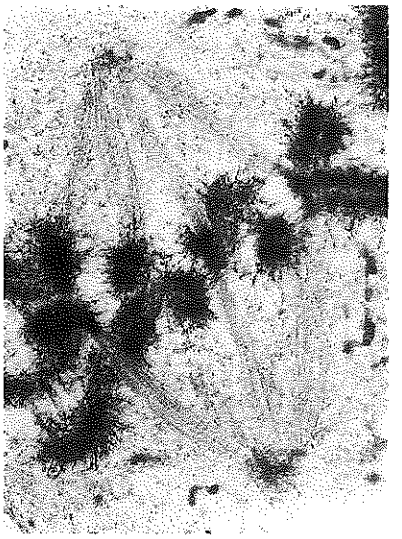
Şekil 11.43 Sentrozomların yapısı
(A) Bir çift sentriyolü çevreleyen sentriyol çevre maddesinden saçılan mikrotübülleri gösteren sentrozoma ait elektron mikroskop görüntüsü. (B) Yapısındaki dokuz adet üçlü mikrotübülün görüldüğü sentriyole ait enine kesit (A, © Cytographics; B, Don Fawcett, Photo Researchers, Inc.)

kirpik (sil) ve kamçı bazal cisimlerine benzeyen (bu bölümde daha sonra anlatılacak) silindirik yapılardır. Sentriyoller, bazal cisimler, kirpik ve kamçıların oluşumu için gereklidirler ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde, henüz tam olarak anlaşılmamış görevleri vardır. Ancak, sentrozomun mikrotübül düzenleyici görevleri için gerekli değildirler ve bitki hücrelerinde, tek hücreli ökaryotların ve mayozdaki hayvan hücrelerinin çoğunda (fare yumurta hücreleri gibi) bulunmazlar. Senriyoller değil, sentriyol çevre maddesi mikrotübül yapılanmasını başlatır. Bununla birlikte, hayvan hücrelerinde sentriyollerin uzaklaştırılması, sentrozom içeriğinin dağılması ve mikrotübül dönüşümünde gecikme ile sonuçlanır.

Sentriyoller, net polaritesi olan kompleks yapılardır, bir ucunda araba tekerleği gibi protein yapısı ve sentrozom içerisinde birçok uzantısı bulunur (Şekil 11.44). Bu uzantıların sentrozom matrisinin düzenlenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Sentriyoller üçerli mikrotübüllerin karakteristik bir parçası olan δ-tübülin gibi birçok



Şekil 11.44 Sentriyol yapısı
Sentriyol, bir ucunda tekerlek protein yapısı diğer uçta dışarıya doğru uzantı yapan farklı tiplerde oluşumlar ile oldukça polar bir yapıdır. Bu oluşumların (uydu ve uzantı olarak tanımlanan) sentrozom matrisi içerisinde spesifik proteinlerle etkileştiği düşünülmektedir. γ-tübülin gibi diğer sentrozom matris proteinleri, sentriyolün lümeni ile bağlantılıdır. Üçlü mikrotübüller, oldukça modifiye olmuş α ve β-tübülin ve değişmemiş δ-tübülin yapılarına sahiptir. Sentrin lifleri, üçlü mikrotübüllerden dışarıya çıkıntı yapar ve diğer sentriyole bağlanır. (W.F. Marshall, 2001. *Curr. Biol.* 11:R487'den değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 11.45 Mitotik iğe ait elektron mikroskop görüntüsü
İğ yapısındaki mikrotübüller metafazdaki, yoğunlaşmış kromozomlara tutunur. (C.L. Rieder ve S.S. Bowser, 1985. *J. Histochem. Cytochem.*33:165/Biological Photo Service)

özgün protein içerir. İnterfaz sırasında iki ~~sentriyol~~, sentrin içeren (kalmodiline benzeyen bir Ca^{2+} bağlayan protein) bir ya da daha fazla lifle bağlantılıdır.

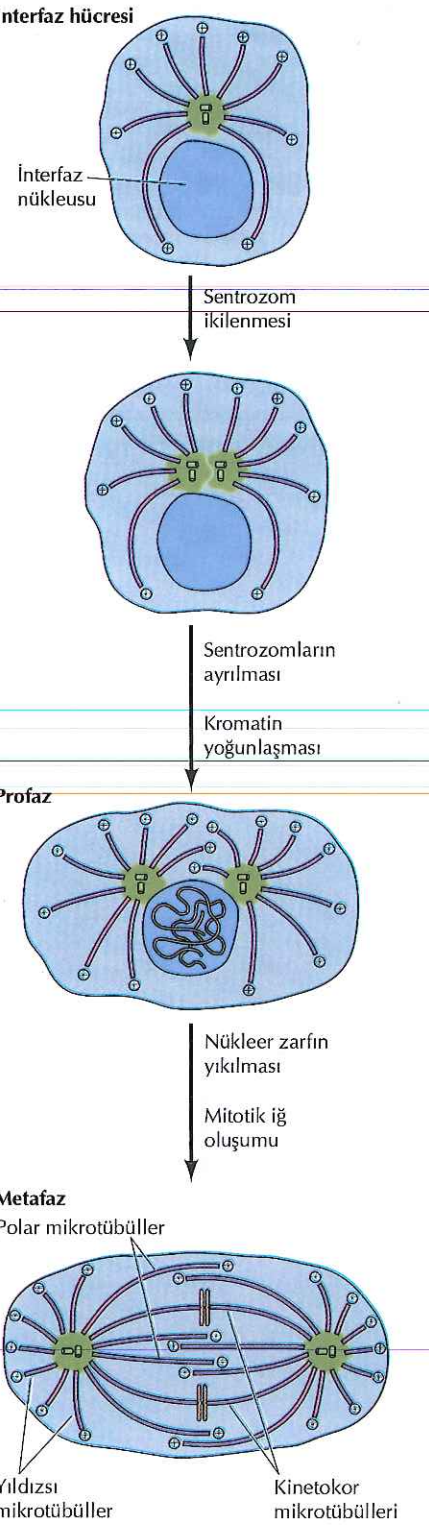
Mitoz Sırasında Mikrotübüllerin Yeniden Düzenlenmesi

Daha önce de belirtildiği gibi, mikrotübüller mitoz sırasında tam olarak yeniden düzenlenirler ve bu, mikrotübüllerin dinamik kararsızlığının önemini gösteren çok çarpıcı bir örnek oluşturur. İnterfazdaki mikrotübül dizisi, ayrışır ve serbest tübülin alt birimleri, kardeş kromozomların ayrımından sorumlu **mitotik iği** oluşturmak üzere, yeniden yapılanır (Şekil 11.45). Mikrotübül hücre iskeletinin yeniden yapılanması, sentrozomun mitotik iğin karşıt kutuplarında, iki ayrı mikrotübül-düzenleyici merkez oluşturacak şekilde iki katına çıkması ile yönlendirilir.

Sentriyoller ve sentrozomun diğer elemanları interfaz hücrelerinde iki katına çıkar, fakat mitoz bölünme başlayıncaya kadar, hücrenin bir bölgesinde bir arada kalır (Şekil 11.46). O zaman, iki sentrozom ayrılır ve nükleusun iki karşıt bölgesine doğru hareket ederler ve mitotik iğin iki kutbunu oluştururlar. Hücre mitoza girdiği zaman, mikrotübüllerin yapılanma ve ayrışma dinamikleri de çok değişir. İlk olarak, mikrotübül ayrışması yaklaşık on kat artar, mikrotübüllerin tam olarak dağılması ve kısalması ile sonuçlanır. Aynı zamanda sentrozomdan çıkan mikrotübül sayısı da beş ila on kat artar. Bunların bir araya gelmesi, interfazdaki mikrotübüllerin ayrışması ve sentrozomdan çok sayıda kısa mikrotübülün uzamasıyla sonuçlanır.

İlk olarak 1986'da Marc Kirschner ve Tim Mitchison tarafından önerildiği gibi, mitotik iğin oluşumu, sentrozomdan yayılan mikrotübüllerden bazılarının seçici olarak stabilizasyonu ile gerçekleşir. Mikrotübüller üç tipdir ve ikisi mitotik iğin bileşiminde bulunur. **Kinetokor mikrotübülleri,** mitotik hücrelerdeki yoğunlaşmış kromozomlara, özgün proteinler ile birleşerek kinetokoru oluşturan sentromerlerinden tutunur (bkz. Şekil 4.19). Kinetokorlara bağlanma bu mikrotübülleri stabize eder, daha sonra da tartışılacağı gibi, mitotik kromozomların ayrılmasında kritik bir rol oynar. Mitotik

Şekil 11.46 Mitotik iğin oluşumu
Sentriyoller ve sentrozom interfazda ikilenirler. Mitozun profaz aşama-sında sentrozomlar ayrılır ve nükleusun zıt bölgelerine doğru hareket ederler. Bu aşamada nükleer zarf çözülür, mikrotübüller mitotik iği oluşturmak üzere yeniden organize olurlar. Kinetokor mikrotübülleri, yoğunlaşmış olan kromozomlara tutunur, polar mikrotübüller birbirleriyle hücrenin ortasında üst üste çakışır ve yıldızsı mikrotübüller hücre çevresinden dışarıya doğru uzanırlar. Metafazda yoğunlaşmış kromozomlar iğin merkezinde dizilirler.



iğde bulunan mikrotübüllerin ikinci tipi (**polar mikrotübüller**) kromozomlara tutunmazlar. Bunun yerine, iki sentrozomdan yayılarak hücre merkezinde birbirleri ile karşılaştıklarında stabilize olurlar. **Yıldızsı mikrotübüller,** sentrozomdan hücrenin kenarına doğru uzarlar ve serbest artı uçları açıktadır. Daha sonra da bahsedileceği gibi, hem polar, hem de yıldızsı mikrotübüller, iği zıt kutuplara iterek kromozom hareketine katkıda bulunurlar.

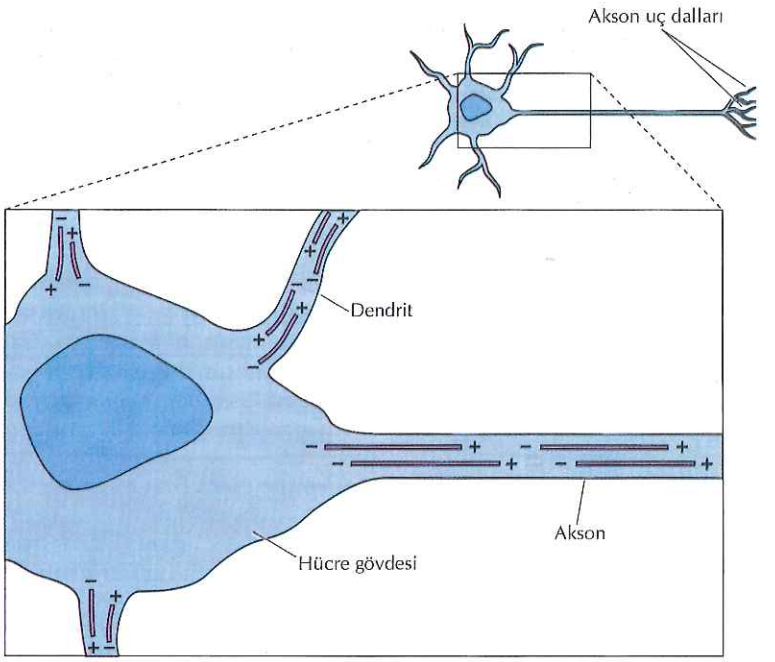
Mitoz devam ederken, kalınlaşmış kromozomlar metafaz plağı üzerinde toplanırlar ve daha sonra, her kromozomun iki kromatidi iğin iki karşıt kutbuna çekilerek ayrılırlar. Kromozom hareketleri, birazdan tartışılacağı gibi, iğ mikrotübülleri ile bağlantılı motor proteinler ile gerçekleştirilir. Mitozun son dönemlerinde, nükleer zarf yeniden oluşur, kromozomlar gevşer ve sitokinez başlar. Böylece, her yavru hücrede, yeni interfaz mikrotübül ağ yapısının oluşumunu başlatacak bir sentrozom yer alır.

Mikrotübüllerin Kararlılığı ve Hücre Polaritesi

Doğal dinamik kararsızlıkları nedeniyle, çoğu mikrotübül hücre içinde ayrışmış durumda bulunur. Bu dinamik davranış, ancak mikrotübüller başka proteinler ile etkileşime girerlerse değişebilir. Bazı hücresel proteinler, ya mikrotübülleri keserek ya da mikrotübüllerin uçlarından tübülin ayrışmasını artırarak mikrotübüllerin yıkımında etkilidirler. Bu proteinlere bir örnek olarak, ilk olarak lösemilerde, proliferatif meme kanserlerinde ve malin over kanserlerinde yüksek düzeyde eksprese olan bir protein, stratmin verilebilir. Diğer proteinler (**mikrotübül bağlayıcı proteinler** ya da **MAP**'lar) mikrotübüllere bağlanır ve onların kararlılık durumlarını belirler. Bir MAP grubu, tübülin/GTP'ye bağlandıkları ve uzayan mikrotübülleri hücredeki spesifik yerleşimlerine doğru izledikleri için, artı uç izleyici proteinler olarak adlandırılır. Diğer MAP'ler mikrotübüllerin ya artı ya da eksi uçlarını kapatır. Bu gibi etkileşimler, mikrotübüllerin hücrede belli yerleşimlerde kararlı kalmasını sağlar ve hücre şeklinin ve polaritesinin belirlenmesinde önemli bir mekanizma oluşturur.

Çok sayıda MAP tanımlanmıştır ve bunlar hücre tipine bağlı olarak, çok farklı olabilirler. En iyi tanımlanmış olanlar, nöronal hücrelerden elde edilen MAP-1, MAP-2 ve tau ile nöronal olmayan tüm omurgalı hücrelerinde bulunan MAP-4 tür. Tau proteini, Alzheimer'lı hastaların beyinlerindeki karakteristik lezyonların ana elemanı olduğu için, geniş ölçüde çalışılmaktadır. MAP'lerin aktiviteleri fosforillenme ile düzenlenir, bu da, hücrenin mikrotübül kararlılığını kontrol etmesini sağlar.

Kararlı mikrotübüllerin hücre polaritesini düzenlemedeki rolünü gösteren güzel bir örnek, sinir hücrelerinde hücre gövdesinden dışarı doğru uzayan iki farklı tipteki oluşumdur (akson ve dendritler) (Şekil 11.47). Hem aksonlar, hem de dendritler kararlı mikrotübüller ve bu bölümde daha önce anlatılan, nörofilamanlar tarafından desteklenir.



Şekil 11.47 Sinir hücrelerinde mikrotübüllerin düzenlenmesi
Sinir hücrelerinin gövdelerinden dışarıya doğru iki farklı oluşum çıkar. Dendritler diğer sinir hücrelerinden uyarıları alan kısa oluşumlardır. Uzun tek bir akson ise uyaranları hücre gövdesinden, diğer hücrelere (diğer nöronlar ya da kas gibi efektör hücre olabilir) taşır. Akson ve dendritlerdeki kararlı mikrotübüller sentrozomda tutulu olmak yerine sitoplazmada son bulurlar. Dendritlerde mikrotübüller artı uçları hem hücre gövdesine yönelik hem de dışarıya yönelik olmak üzere her iki yöne doğrudur. Bunun tersine, bütün akson mikrotübülleri artı uçları aksonun ucuna doğru olacak şekilde yerleşiktir.

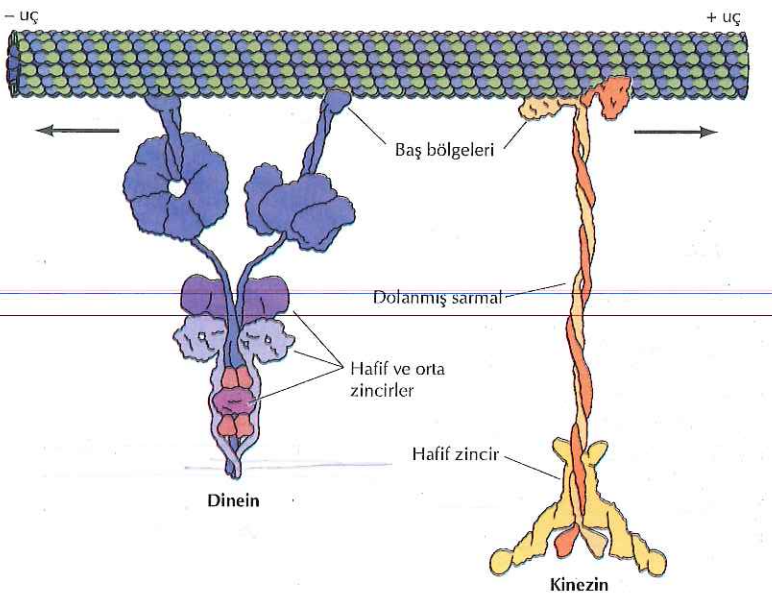
Ancak, akson ve dendritlerdeki mikrotübüller farklı şekilde düzenlenmiştir ve farklı MAP'ler ile bağlıdır. Aksonlarda, mikrotübüllerin hepsi diğer hücre tiplerindeki mikrotübüllerin genel yönlenimlerine benzer olarak, artı uçları ile hücre gövdesinden uzağa yönelmişlerdir. Ancak, aksonlardaki mikrotübüllerin çoğunda, eksi uçlar sentrozoma tutunmuş değildir, bu mikrotübüllerin artı ve eksi uçları, aksonun sitoplazmasında sonlanır. Dendritlerde mikrotübüller her iki tarafa da yönlenmiştir, bazı artı uçlar hücre gövdesi, bazıları hücre kenarı doğrultusundadır. Mikrotübül yapılanmasındaki bu fark ile, MAP'lerdeki farklılıklar paraleldir: Aksonlarda tau proteinleri bulunurken, MAP-2 bulunmaz, dendritlerde ise MAP-2 vardır, tau proteini bulunmaz, MAP-2 ve tau dağılımındaki bu farklılığın akson ve dendritlerdeki kararlı mikrotübüllerin farklı düzenlenmelerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir.

Mikrotübül Motorları ve Hareket

Mikrotübüller hücre içi hareket, zar veziküllerinin ve organellerin yer değiştirmesi, mitozda kromozomların ayrılması, sil ve kamçıların hareketini içeren çok çeşitli hücre hareketilerinden sorumludur. Bu bölümde daha önceki kısımlarda aktin filamanlarında da anlatıldığı gibi, mikrotübüller boyunca hareket, ATP hidrolizinden elde ettiği enerjiyi kullanarak güç ve hareket oluşturan, motor proteinlerin çalışması esasına dayanır. İki büyük motor protein ailesinin üyeleri olan **kinezinler** ve **dineinler,** mikrotübüllerin katıldığı çok çeşitli hareket için güç sağlamakla yükümlüdür.

Mikrotübül Motor Proteinlerinin Tanımlanması

Mikrotübül motor proteinlerinin prototipi olan kinezinler ve dineinler, mikrotübül boyunca zıt yönlerde ilerlerler, çoğu kinezin artı uca ve dinein ise eksi uca doğru hareket eder (Şekil 11.48). Mikrotübül motor



Şekil 11.48 Mikrotübül motor proteinleri
Kinezin ve dinein, mikrotübüller üzerinde sırasıyla artı ve eksi uçlara doğru zıt yönlerde hareket eder. Kinezin, birbiri etrafında dolanan iki ağır zincire ve iki hafif zincire sahiptir. Ağır zincirlerin globüler baş bölgeleri mikrotübülleri bağlar ve molekülün motor bölgeleridir. Dinein, çoklu hafif ve orta boydaki zincirlerle bağlantılı iki ya da üç ağır zincire (şekilde iki tanesi gösterilmiştir) sahiptir. Ağır zincirlerin globüler baş bölgeleri motor bölgelerdir. Şekilde gösterilen modeller yakın tarihte elde edilen X-ışını kristallografisi verilerine dayalıdır (R.D. Vale, 2003. *Cell* 112:467).

proteinlerinden ilk tanımlanan, 1965'de Ian Gibbons tarafından izole edilen dineindir. Kirpiklerde bu tip dineinin (**aksonemal dinein** olarak adlandırılır) çok yüksek miktarda bulunması, aynen kas hücrelerinde miyozin baskın olduğu için elde edilmesinin kolaylaşması gibi, saflaştırılmasını kolaylaştırmıştır. Ancak, diğer mikrotübül-temelli motorların tanımlanması, kromozom hareketi ve organel taşınması gibi olaylardan sorumlu proteinlerin izolasyonu, sitoplazmada göreli olarak daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için, problemli olmuştur. Bu nedenle, bu proteinlerin elde edilebilmesi, moleküler motorların hareketlerini hücresiz sistemlerde saptayabilen yeni deneysel yöntemlerin gelişmesine bağlıdır.

Sitoplazmadaki motor proteinler için *in vitro* ölçüm yöntemleri geliştirilmesi, 1980'lerin başlarında Robert Allen ve Shinya Inoué tarafından, zar vezikülleri ve organellerin akson kollarındaki mikrotübüller boyunca hareketini araştırmak için geliştirilen **video ile güçlendirilmiş mikroskobun** kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastını artırmak için bir video kamera kullanılmış, böylece küçük cisimlerin saptanmasında ve canlı hücrelerin izlenmesi ile organel hareketlerinin belirlenmesinde bir gelişme sağlanmıştır. Bu yöntemi kullanarak, Allen, Scott Brady ve Ray Lasek, plazma zarının uzaklaştırıldığı ve sitoplazma içeriğinin bir cam lam üzerine yayıldığı, hücresiz sistemlerde de, organel hareketlerinin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu gözlem, *in vitro* yeniden kurulan sistemlerin geliştirilmesine öncülük yapmıştır ve organel hareketlerinden sorumlu hücresel proteinleri saptayabilecek kapasitede bir ölçüm geliştirilmesi sağlamıştır. Brady ile birlikte, Ronald Vale, Thomas Reese ve Michael Sheetz 1985'de bu gelişmelerden yararlanarak, hem aksonların kollarında hem de sığır beyninde bulunan yeni bir mikrotübül motor proteini olan kinezinleri tanımlamışlardır (günümüzde "geleneksel" kinezinler ya da kinezin I olarak bilinir).

Daha sonraki çalışmalar kinezin I'in, mikrotübül boyunca yalnızca bir yöne -artı uca doğru yer değiştirdiğini göstermiştir. Aksonlardaki mikrotübüllerin artı uçları, hücre gövdesinden uzağa doğru yönlendik-

ANAHTAR DENEY

Kinezinin İzolasyonu

Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility

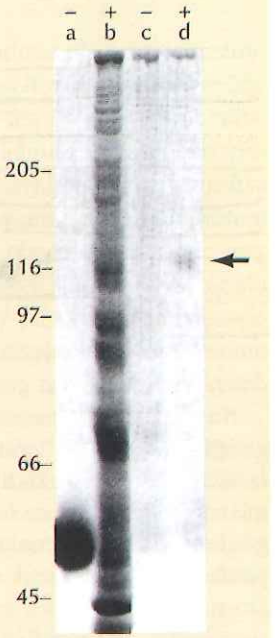
Ronald D.Vale, Thomas S. Reese, Michael P. Sheetz
National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA; University of Connecticut Health Center, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA
Cell, Volume 42, 1985, pages 39-50

Bağlam

Ökaryot hücrelerin organizasyonu için sitoplazmik organellerin taşınması ve yerleşimi önemlidir. Bundan dolayı vezikül ve organel taşınmasından sorumlu mekanizmaların anlaşılması hücre biyolojisinin temel sorularından bir tanesidir. 1982 yılında, Robert Allen, Scott Brady, Ray Lasek ve arkadaşları, *in vivo* ve hücreden bağımsız sistemlerde, dev kollu aksonlarda sitoplazmik filamanlar boyunca organellerin hareketini gözlemek amacıyla, video ile desteklenmiş mikroskop kullandılar. Bu filamanlar daha sonra, elektron mikroskopisi ile mikrotübül olarak tanımlandı, ancak organel hareketinden sorumlu olan motor proteinler bilinmiyordu. O zamanlarda tanımlanan tek mikrotübül motoru, silleri ve kamçılarda bulunan aksonemal dineindi. Ronal Vale, Thomas Reese ve Michael Sheetz 1985'de, mikrotübüller boyunca organellerin hareketinden sorumlu yeni bir motor protein olan kinezinin izolasyonunu tanımladılar. Aynı dönemde Scott Brady tarafından, benzer deneyler bildirildi (*Nature*, 1985, 317:73-75).

Deneyler

Kinezinin eldesinde iki deneysel strateji önemliydi. Birincisi, Allen ve arkadaşlarının çalışmalarına dayalı olan ve motor protein aktivitesinin saptanabileceği *in vitro* bir sistemin kullanımıydı. Vale, Reese ve Sheetz ise, aksonların sitoplazmasında bulunan proteinlerde mikrotübüllerin cam lamellerin yüzeyinde hareketi için gerekli gücün olduğunu buldukları, bir sistem kullandılar. Bu hücresiz sistem bir moleküler motor olarak kinezinin aktivitesinin ölçümünde duyarlı ve hızlı fonksiyonel analiz sağlamaktaydı.



AMP-PNP varlığında mikrotübüllere motor proteinlerin bağlanması. Protein örnekler poliakrilamid jelde elektroforez ile analiz edildi, boyandı ve fotoğraflandı. Belirteç proteinlerin moleküler ağırlıkları solda kilodalton bazında verilmektedir. a kolonu saflaştırılan mikrotübülleri göstermektedir ve sadece tübülin (55 kd) saptanmıştır. b kolonu mürekkep balığı akson sitoplazmasının çözünebilir özütüdür ve birçok farklı polipeptid içermektedir. Bu özüt mikrotübüller ile AMP-PNP yokluğunda (c kolonu) ve varlığında (d kolonu) inkübe edildi. Mikrotübüller izole edildikten sonra bağlı proteinlerin serbest kalması amacıyla ATP ile inkübe edildi ve bu proteinlerin elektroforezi gerçekleştirildi. AMP-PNP varlığında mikrotübüllere 110-kd büyüklüğünde bir polipeptidin spesifik olarak bağlandığı ve ATP varlığında serbest kaldığı görülmektedir. AMP-PNP varlığında bağlanıp ATP tarafından serbest kalan proteinler, aynı zamanda mikrotübül hareketini indüklemektedir (jelin üst bölümünde '+' ile gösterilenler).

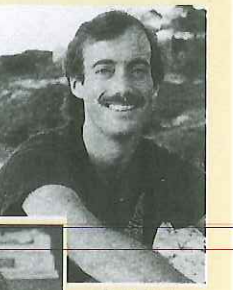
leri için (bkz. Şekil 11.47), kinezin I'in bu doğrultudaki hareketleri ile veziküller ve organeller hücre gövdesinden uzağa, aksonların uçlarına doğru taşınır. Bununla birlikte sağlam aksonlarda veziküller ve organellerin geriye hücre gövdesine doğru hareket ettikleri gözlenmiştir, bu da mikrotübüller boyunca karşıt yöne-eksi uca doğru hareketten sorumlu, farklı bir motor proteinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu öngörüye uygun olarak, daha sonraki deneyler, daha önceleri mikrotübül-bağlayan protein MAP-1C olarak tanımlanmış bir proteinin, aslında mikrotübüllerin eksi ucu yönündeki hareketi sağlayan motor protein olduğunu göstermiştir. İleri incelemeler, MAP-1C nin sillerden izole edilen dinein (aksonemal dinein) ile ilintili olduğunu göstermiştir, bu nedenle günümüzde **sitoplazmik dinein** olarak anılmaktadır.

Kinezinin eldesinde kullanılan ikinci önemli yaklaşım, proteinin mikrotübüllere bağlanma özelliğinden yararlanmaktaydı. Lasek ve Brady (Nature, 1985, 316:645-647), mikrotübüllerin in vitro hareketinin ATP'ye gereksinim duyduğunu ve bunun ATP analoğu (adenilil imidodifosfat, AMP-PNP) ile inhibe edildiğini gösterdiler. AMP-PNP varlığında, organeller mikrotübüllere bağlı kaldılar ve bu durum organel hareketinden sorumlu olan motor proteinlerin de mikrotübüllere bağlı kalmış olabileceğini desteklemekteydi.

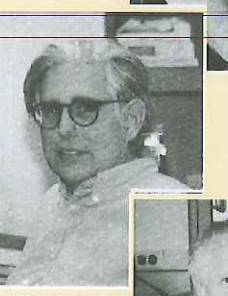
Bu bulgulara dayanarak, Vale ve arkadaşları, AMP-PNP varlığında mikrotübüller ile akson kollarından elde edilen sitoplazmik proteinleri inkübe ettiler. Daha sonra mikrotübüller elde edildi ve hidrolize edilemeyen ATP analoğu varlığında, spesifik olarak bağlanan proteinlerin salınımı için, ATP ile inkübe edildi. Bu deneyde AMP-PNP varlığında mikrotübüllere bağlanan ve ATP varlığında inkübe edildiğinde serbest kalan 110 kd'luk bir polipeptid tanımlandı (şekil). Bunun ötesinde mikrotübüllere bağlanıp ATP tarafından serbest bırakılan proteinlerin *in vitro* koşullarda mikrotübüllerin hareketini desteklediği gösterildi. Bu nedenle, AMP-PNP varlığında mikrotübüllere bağlanma, motor proteinlerin izolasyonunda etkin bir yaklaşım sağlamaktaydı. Daha sonra gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar ise, 110 kd luk polipeptidin 60-70 kd ağırlığındaki polipeptidlerle kompleks yaptığını gösterdi. Benzer bir yaklaşım ile, sığır beyninden de, ilişkili başka bir protein saflaştırıldı. Yazarlar bu proteinlerin yapısal ve enzimatik olarak dineinden farklı yeni bir grup hareket proteinini temsil ettiğini bildirip, bu yer değiştiricilerin kinezin (Yunanca'da kinein, hareket etmek den gelmektedir) olarak adlandırılmasını önerdiler.

Etki

Vezikül ve organellerin mikrotübüller üzerinde hareketi, ökaryotik hücrenin organizasyonu bakımından önemlidir. Bu nedenden dolayı, bu tip hareketlerden sorumlu olan motor proteinler hücre biyolojisinde kritik roller üstlenmektedir. Burada tanımlanan deneylere benzer şekilde gerçekleştirilen sonraki deneylerde, kinezinin mikrotübül boyunca (+) uç yönünde hareket ettiği ve dineinin vezikül ve organellerin mikrotübülün (-) ucu yönündeki hareketinden sorumlu olduğu gözlendi. Bunun ötesinde, kinezin ilişkili geniş bir protein ailesi tanımlandı. Vezikül ve organel transportundaki rollerinin yanı sıra, bu motor protein ailesinin üyeleri, mitoz sırasında kromozomların ayrılması ve dağılmasından sorumludur. Bu nedenle kinezinin tanımlanması ökaryot hücrelerin yapı ve fonksiyonu için önemli olan, mikrotübüle dayalı hareketlerin anlaşılmasında kolaylık sağlamıştır.



R. D. Vale



T.S. Reese

M. P. Sheetz

Kinezin I, yaklaşık 380 kd luk, iki ağır zincir (her biri 120 kd) ve iki hafif zinciri (her biri 64 kd) bir proteindir (bkz. Şekil 11.48). Ağır zincirlerde uzun α-sarmal bölgeleri, birbirlerinin üzerine dolanan-sarmal yapısındadır. Ağır zincirlerdeki amino ucu globüler baş bölümleri, molekülün motor bölgeleridir. Hem mikrotübüllere hem de ATP'ye bağlanır ve hidrolizi ile, hareket için gerekli enejiyi sağlar. Kinezinin motor bölümü (yaklaşık 340 amino asit) miyozininkinden (850 amino asit kadar) çok daha küçük olsa da, X-ışını kristallografisi kinezin ve miyozinin (bkz. Şekil 11.31) aynı ortak atadan evrimleştiğini ve yapısal olarak benzer olduklarını göstermektedir. Kinezin molekülünün kuyruk kısmı, ağır zincirin karboksi uç bölgesi ile bağlanmış hafif zincirler içerir. Kinezinin bu bölgesi kinezin motorunun etkisi ile, mikrotübül boyunca taşınacak diğer hücresel elemanlara (zar vezikülleri ve organeller gibi) bağlanmadan sorumludur.

Sitoplazmik dinein, her biri değişken sayıdaki, boyutları 14 ila 120 kd arasında değişen, hafif veya orta boyuttaki zincirler ile kompleks oluşturan, iki ya da üç ağır zincir (her biri yaklaşık 500 kd) içeren, çok büyük bir moleküldür (2000 kd kadar) (bkz. Şekil 11.48). Kinezinde

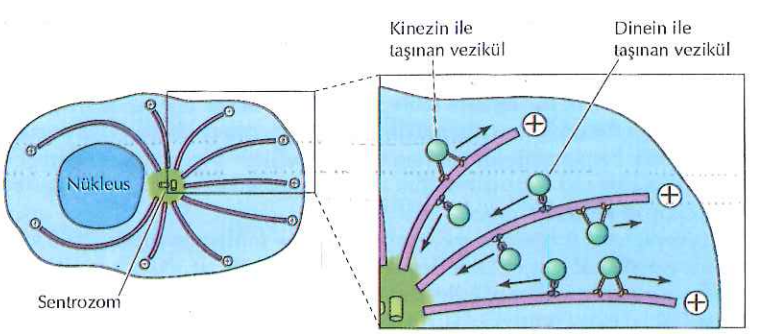
olduğu gibi, ağır zincir, mikrotübüller boyunca hareketten sorumlu olan globuler ATP-bağlayan motor bölgeleri oluşturur. Molekülün hafif ve orta boy zincirleri içeren ana bölümünün, organeller ve veziküller gibi diğer hücresel yapılara bağlandığı düşünülmektedir.

Miyozin gibi, kinezin ve dinein de ilintili motor protein aileleri oluştururlar. Kinezinin 1985'deki ilk izolasyonu sonrasında, kinezin ile ilintili birçok protein tanımlanmıştır. *C.elegans* genomu onsekiz farklı kinezin kodlamaktadır, insandaki kinezin ailesinin ise, en az 100 farklı üyesi olduğu düşünülmektedir. Kinezin ailesinin, kinezin I gibi bazı üyeleri, mikrotübüllerde artı uç yönünde hareket eder (bkz. Şekil 11.48). Buna karşın, kinezin ailesinin diğer bazı üyeleri ise, karşıt yönde, eksi uca doğru ilerler. Kinezin ailesinin bu farklı üyelerinin karboksi ucundaki kuyruklarının dizilimleri değişkendir ve veziküller, organeller ve kromozomlar gibi farklı tipteki kargoların mikrotübül boyunca hareketlerinden sorumludurlar. Aksonemal dineinlerin de, sitoplazmik dineinler gibi, birçok tipi vardır. Dinein ailesi üyelerinin tamamı mikrotübüllerin eksi uçlarına doğru hareket ederler, fakat farklı sitoplazmik dineinler farklı kargoları taşıyabilir.

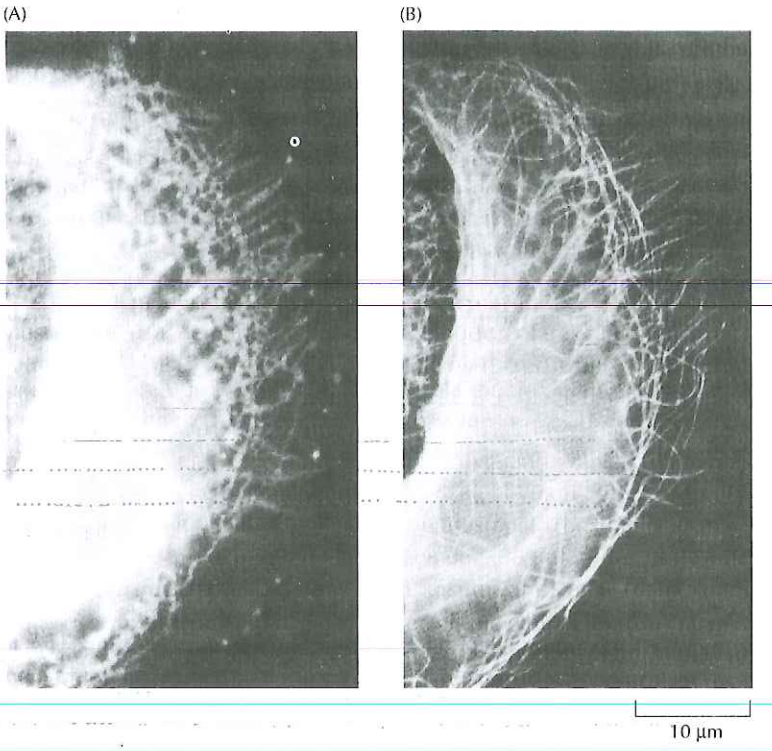
Organel Taşınması ve Hücre İçi Düzenlenme

Mikrotübüllerin esas rollerinden birisi, zar veziküllerini ve organelleri ökaryot hücrelerin sitoplazmaları boyunca taşımaktır. Daha önce de tartışıldığı gibi, bu gibi sitoplazmik organel taşınımları, özellikle sinir hücrelerinin bir metreden daha çok uzayabilen aksonlarında kanıtlanmıştır. Ribozomlar ise, yalnızca hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunurlar, yani proteinler, zar vezikülleri ve organeller (örn., mitokondri) mutlaka hücre gövdesinden aksonlara taşınmalıdır. Video ile güçlendirilmiş mikroskopi yoluyla, zar veziküllerinin ve organellerin akson mikrotübülleri boyunca, her iki yönde de taşındığı görüntülenebilir, burada kinezin ve dinein, sırasıyla, aksonların uçlarına ve uçlarından kendi yüklerini taşırlar. Örneğin, nörotransmiterleri içeren salgı vezikülleri, Golgi aygıtından aksonların uç dallarına kinezin ile taşınırlar. Ters yönde, sitoplazmik dinein, endositik vezikülleri aksondan hücre gövdesine taşır.

Diğer hücre tiplerinde de mikrotübüller zar veziküllerini ve organelleri benzer şekilde taşır. Mikrotübüller sentrozomlara eksi uçları ile tutunarak, artı uçları hücre kenarına doğru yönlendiğinden, kinezin ve dinein ailesinin farklı üyelerinin vezikül ve organelleri sitoplazma boyunca zıt yönlere taşıdıkları düşünülmektedir (Şekil 11.49). Geleneksel kinezinler ve diğer, artı uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri, kargolarını hücre kenarına doğru taşırken, sitoplazmik



Şekil 11.49 Mikrotübüller boyunca veziküllerin iletimi
Kinezin ve kinezin ailesinin artı uca yönelen diğer üyeleri, hücre çevresine doğru çıkıntı yapan mikrotübülün artı uçları yönünde vezikül ve organelleri taşır. Bunun tersine, dinein ve kinezin ailesinin eksi uca yönelen üyeleri, hücrenin merkezinde bulunan mikrotübülün eksi uçları yönünde kargolarını taşırlar.



Şekil 11.50 Endoplazmik retikulumun mikrotübüller ile bağlantısı
Epitel hücrede bulunan endoplazmik retikulumun (A) ve mikrotübüllerin (B) floresan mikroskopisi. Endoplazmik retikulum floresan bir boya ile ve mikrotübüller tübüline spesifik bir antikor ile boyalıdır. Hücre çeperinde endoplazmik retikulum ve mikrotübüllerin yakın ilişkisine dikkat ediniz (M. Terasaki, L.B. Chen ve K. Fujiwara, 1986. *J. Cell Biol.* 103:1557).

dinein ve eksi uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri, maddeleri hücrenin merkezine doğru taşır. Endositik ve salgısal yolaklardaki zar veziküllerinin taşınmasına ek olarak, mikrotübüller ve ilişkili motor proteinler, zarla kaplı organellerin (endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar, mitokondri gibi) hücre içerisinde yerleşimini düzenlerler. Örneğin endoplazmik retikulum, mikrotübüllere bağlanarak hücre kenarına doğru uzanır (Şekil 11.50). Mikrotübülleri depolimerize eden ilaçlar, endoplazmik retikulumun hücre merkezine doğru gerilemesine neden olurlar. Bu durum, endoplazmik retikulumun yaygın durumunun korunması için mikrotübüller ile bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Endoplazmik retikulumun hücredeki yerleşiminde, onu mikrotübüller boyunca hücre kenarına doğru artı uç yönünde çeken kinezinin (ya da olasılıkla kinezin ailesinin birçok üyesinin) etkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, kinezinin, lizozomların hücre merkezinden uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayabileceği ve kinezin ailesinin üç değişik üyesinin, mitokondri hareketinde görev aldığı gösterilmiştir.

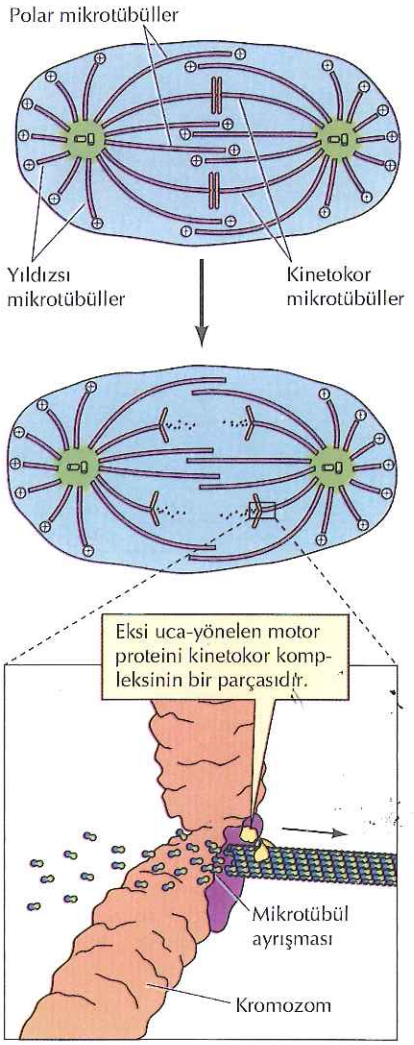
Bunun aksine, sitoplazmik dineinin, Golgi aygıtının yerleşiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Golgi aygıtı, sentrozom yakınında hücrenin ortasında yerleşiktir. Eğer mikrotübüller, ilaçla ya da hücre mitoza girdiğinde yıkılırsa, Golgi, sitoplazma geneline yayılan küçük veziküllere ayrılır. Mikrotübüller yeniden oluştuğunda, Golgi vezikülleri, sitoplazmik dinein aracılıyla hücrenin merkezine (mikrotübüllerin eksi ucuna doğru) taşınır ve Golgi aygıtı yeniden yapılanır. Bu nedenle, ökaryot hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen mikrotübüller boyunca hareket, sadece vezikül transportundan değil zarla çevrili organellerin yerleşiminden de sorumludur.

Mitotik Kromozomların Ayrılması

Bu bölümde daha önceden tartışıldığı gibi, mitozun başında mikrotübüller, iki katına çıkan kromozomları yavru nükleuslara dağıtarak, hücre bölünmesinde önemli rol oynayan mitotik iği oluşturmak üzere, yeniden düzenlenirler. Genetik materyalin bu kritik öneme sahip dağılımı, kardeş kromatidlerin ayrıldığı ve iğin zıt kutuplarına hareket ettiği, mitozun anafaz aşamasında gerçekleşir. Kromozom hareketi, farklı iğ mikrotübülleri ve ilişkili motor proteinleri içeren, **anafaz A** ve **anafaz B** olarak tanımlanan iki farklı mekanizmada izlenir.

Anafaz A, kromozomların kinetokor mikrotübülleri boyunca iğ kutuplarına doğru hareketinden sorumludur ve kromozom hareket ettikçe kinetokor mikrotübülleri kısalmaktadır (Şekil 11.51). Bu tip kromozom hareketinin, kromozomları sentrozoma doğru ve iğ mikrotübüllerinin eksi ucu yönüne doğru ileten kinetokor bağlantılı motor proteinler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Sitoplazmik dinein, kinetokorlar ile bağlantılıdır ve kinezin ailesinin eksi uca yönelen üyeleri gibi kutuplara yönelik kromozom hareketinde rol oynayabilir. Kinetokor motor proteinlerin bu davranışı, kinetokor mikrotübüllerinin ayrışması ve kısalması ile eşleşmiştir. Bu olay, mikrotübül kararsızlaştıran enzim gibi davranan, kinezin ailesinin bazı üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir.

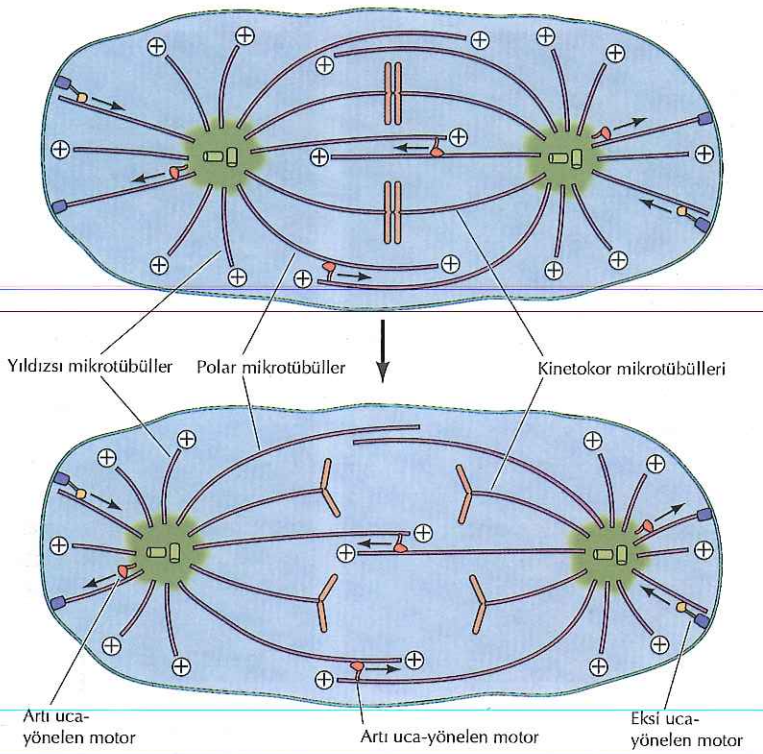
Anafaz B, iğ kutuplarının kendiliğinden ayrılmasını kapsar (Şekil 11.52). Bu ayrılma, iğ mikrotübüllerinin uzaması eşliğinde gerçekleşir ve mitozun başlangıcında ikilenmiş sentrozomların iğ kutuplarını oluşturmak üzere, ilk ayrışmasına benzerdir (bkz. Şekil 11.46). Anafaz B sırasında, üst üste çakışan polar mikrotübüller, iğ kutuplarını iterek birbirlerinin üzerinde kayarlar. Bu tip hareketin, polar mikrotübülleri çapraz bağlayarak, onları üst üste çakıştığı mikrotübülün artı ucuna doğru, karşıt kutuptan uzağa hareket ettiren, çok sayıda artı uca yönelen kinezin ailesi üyelerinin etkisiyle olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, iğ kutupları, yıldızsı mikrotübüller tarafından birbirinden ayrılabilirler. Bu tip bir hareketten sorumlu olan mekanizma henüz tanımlanmamıştır, ancak hücre korteksine veya sitoplazmadaki başka bir yapıya tutunan, sitoplazmik dineinin etkisi sonucunda gerçekleşiyor olabilir. Eksi uç yönünde, bu gibi yıldızsı mikrotübüllere tutunmuş dinein motorunun yer değiştirmesi, iğ kutuplarının ileriye, hücre kenarına çekilmesine neden olabilir. Alternatif olarak, iğ kutupları ile ilişkili bir motor protein, artı uç yönüne doğru yıldızsı mikrotübüller boyunca hareket ederek, iğ kutuplarını hücre kenarına doğru çekebilir.



Kirpikler ve Kamçılar

Kirpikler ve **kamçılar**, çeşitli ökaryot hücrenin hareketinden sorumlu olan, plazma zarının mikrotübül temelli uzantılarıdır. Birçok bakteride de kamçılar bulunmaktadır, fakat prokaryot kamçıları ökaryotlardakilerden oldukça farklıdır. Bakteri kamçıları (burada daha fazla tartışılmayacaktır) mikrotübül destekli plazma zarı uzantıları değil, hücre yüzeyinden dışarıya doğru uzanan protein filamanlarıdır.

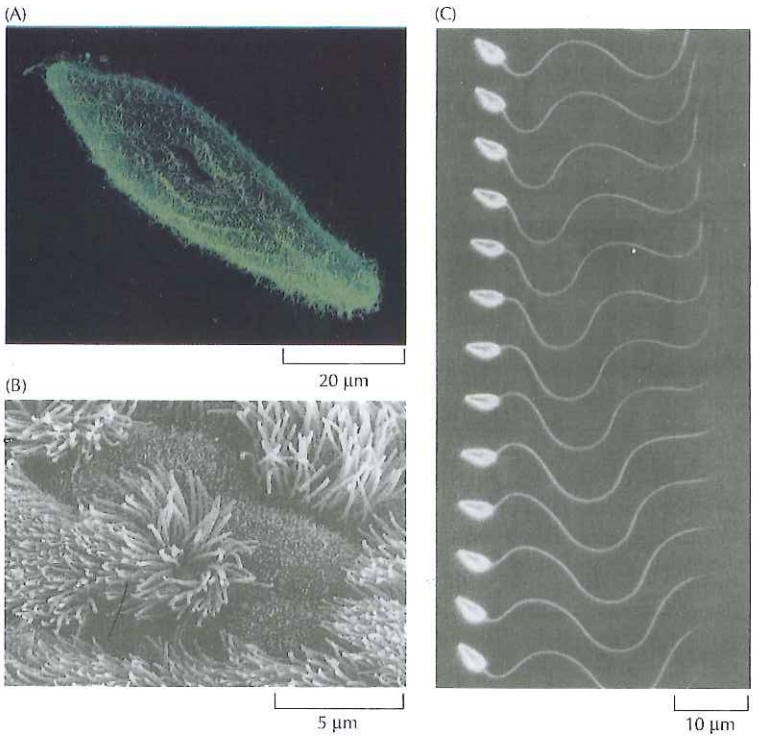
Şekil 11.51 Anafaz A kromozom hareketi
Kromozomlar, kinetokor mikrotübülleri boyunca iğ kutuplarına doğru hareket eder. Kromozom hareketinin, eksi uca yönelen kinetokor bağlantılı motor proteinler ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Motor proteinlerin bu davranışı, kinetokor mikrotübüllerinin çözülmesi ve kısalması eşliğinde gerçekleşir.



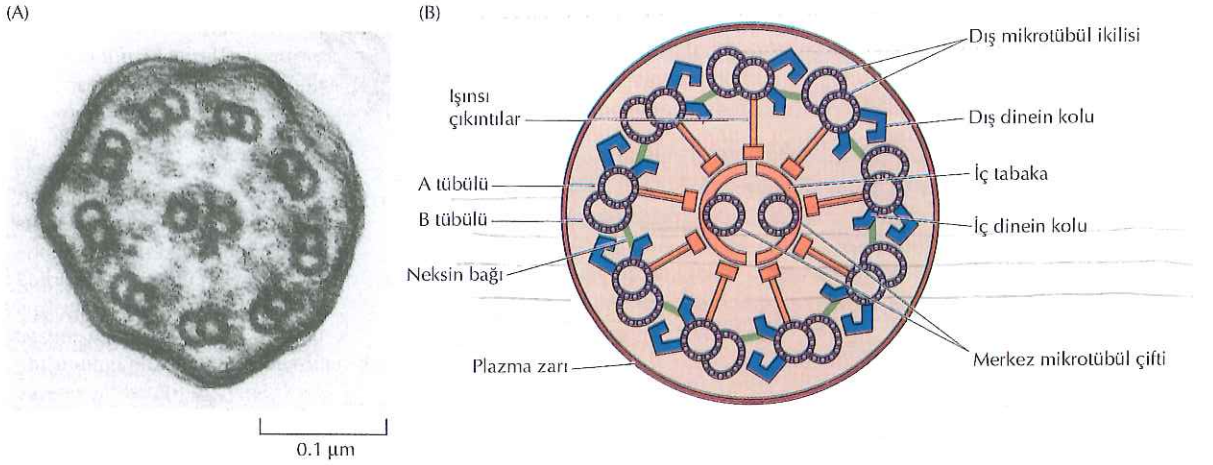
Şekil 11.52 Anafaz B'de iğ kutbunun ayrılması
İğ kutuplarının ayrılması iki tip hareketten kaynaklanır. İlk olarak, üst üste çakışan polar mikrotübüller iğ kutbunu ayırmak üzere birbiri üzerinde kayar. Bu durum olasılıkla artı uca yönelen motor proteinlerin davranışının sonucudur. İkinci olarak, iğ kutupları yıldızsı mikrotübüller tarafından çekilirler. Bunu sağlayan güç, hücre korteksi gibi sitoplazmik yapıya bağlı olan eksi uca yönelen ya da iğ kutbu ile bağlantılı olan artı uca yönelen bir motor olabilir.

Ökaryotlardaki kirpik ve kamçılar her biri yaklaşık 0.25 μm çapa sahip, birbirine çok benzer yapılardır (Şekil 11.53). Birçok hücre, uzunluğu yaklaşık 10 μm olan çok sayıda kirpik (sil) ile kaplıdır. Kirpikler düzenli bir şekilde ileri-geri hareketleri yaparak, titreşerek, hücreyi sıvı içerisinde ya da sıvıyı hücre yüzeyinde hareket ettirir. Örneğin, *Paramesyum* gibi bazı protozoaların kirpikleri, hem hücre hareketinden, hem de hücre yüzeyi ve hücre yüzeyinde yüzen besinin ağız boşluğu içine alınmasından sorumludur. Hayvanlarda, kirpiklerin önemli bir fonksiyonu da, sıvıyı ya da mukusu, epitel hücre tabakalarının yüzeyinde hareket ettirmektir. Buna iyi bir örnek, solunum yollarını döşeyen ve solunum yollarından mukus ve tozları uzaklaştıran, kirpikli hücrelerdir. Kamçılar 200 μm'ye varabilen uzunlukları ve dalga benzeri titreşme hareketleri bakımından kirpiklerden farklıdır. Hücreler genellikle çeşitli protozoaların ve spermlerin hareketinden sorumlu olan sadece bir ya da iki kamçı içermektedir.

Hem kirpik hem de kamçının temel yapısı, mikrotübüller ve ilişkili proteinlerinden oluşan **aksonemdir** (Şekil 11.54). Mikrotübüller, dokuz çift dış mikrotübül ile çevrili bir çift merkez mikrotübülünden oluşan '9+2' formatında düzenlenmişlerdir. Dışta bulunan birbirine kaynaşmış her ikili farklıdır: bunlardan biri (A tübülü adı verilen) 13



Şekil 11.53 Kirpik ve kamçı örnekleri
(A) *Paramecium*'un yüzeyini kaplayan çok sayıda kirpiği gösteren tarayıcı elektron mikroskop görüntüsü. (B) Trake yüzeyini kaplayan kirpikli epitel hücrelerinin tarayıcı elektron mikrografı (C) Deniz kestanesi sperm kamçısının dalga benzeri hareketini gösteren çoklu flaş (500 flaş/saniye) fotoğrafı (A, Karl Aufderheide/Visuals Unlimited; B, Fred E. Hossler/Visuals Unlimited; C, C. J. Brokaw, California Institute of Technology).

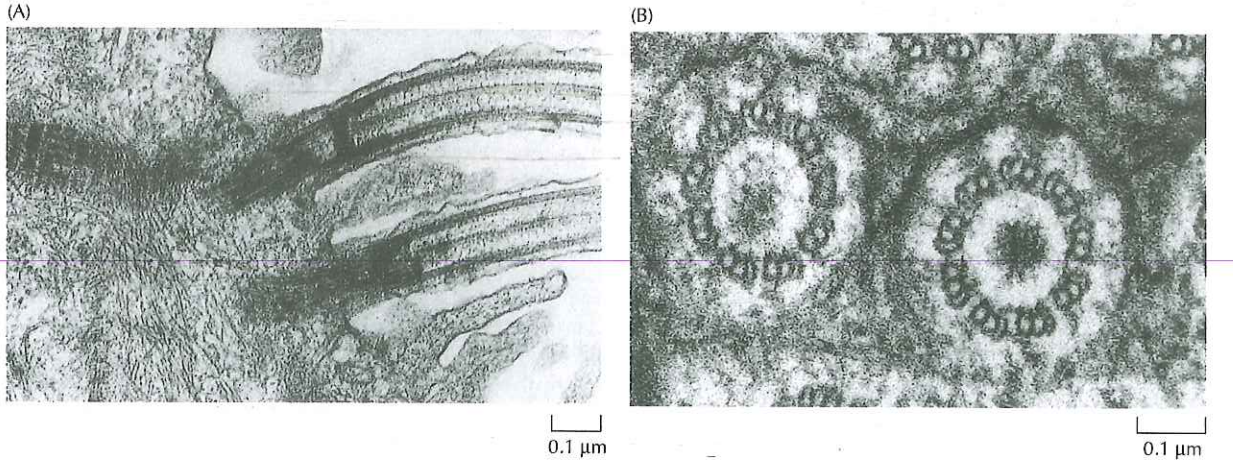


Şekil 11.54 Kirpik ve kamçının aksonem yapısı
(A) Sıçan sperm kamçısının aksoneminin enine kesitsel, bilgisayar destekli elektron mikroskop görüntüsü. (B) Aksonemin şematik enine kesiti. Dışarı doğru yerleşik olan dokuz adet ikili bir tam (A) ve yapısında sadece 10 ya da 11 önfilaman içeren bir tam olmayan (B) mikrotübül içerir. Bu ikililer birbirleriyle neksinler aracılığıyla ve merkezdeki mikrotübül çiftine, ışınsı çıkıntılar aracılığla bağlanır. Dışarı doğru yerleşik olan bu mikrotübül çiftlerinin her biri iç ve dış dinenin kolları ile ilişkilidir (A, K.G. Murti/Visuals Unlimited).

önfilamana sahip olan tam bir mikrotübüldür; diğeri ise (B tübülü) tam bir mikrotübül yapısına sahip değildir ve A tübülüne kaynaşmış halde 10 ya da 11 önfilaman içerir. Dış mikrotübül çiftleri merkez-deki mikrotübül çiftine ışınsı çıkıntılar ve birbirlerine de **neksin** adı verilen bağlantılar aracılığla bağlıdır. Buna ek olarak, her bir A tübülüne, iki dinein kolu tutunmuştur, bu aksonemal dineinlerin motor aktiviteleri, kirpik ve kamçının titreşme hareketini sağlar.

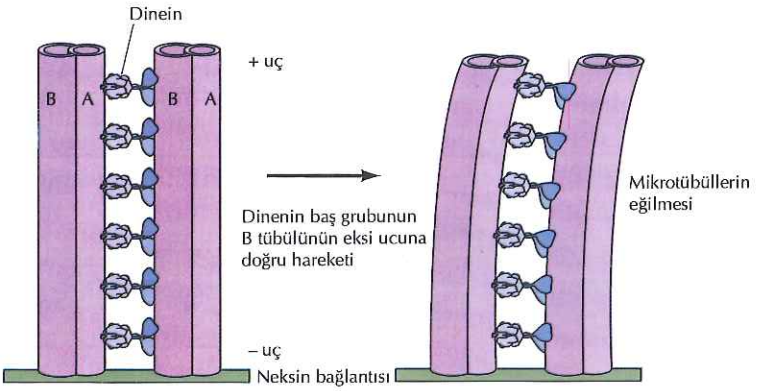
Kirpik ve kamçıların yapısında bulunan mikrotübüllerin eksi uçları, dokuz adet mikrotübül üçlüsü içeren ve yapısı sentriyole benzeyen **bazal cisim** içinde tutunmuştur (Şekil 11.55). Sentrozom elemanları olarak önceden bahsedilmiş olan sentriyoller, bu yapı içerisinde kompleks bir işleve sahiptirler. Bununla birlikte, bazal cisimler, aksonem mikrotübüllerinin düzenlenmesinde açık bir role sahiptir. Aksonemin dışındaki mikrotübül çiftlerinin her biri, bazal cismin içindeki üçlülerde bulunan iki mikrotübülün uzamasıyla gelişir. Bu bakımdan bazal cisimler, kirpik ve kamçıyı hücre yüzeyinde tutmanın yanı sıra, aksonemal mikrotübüllerin uzamasını başlatmakla da görevlidirler.

Kirpik ve kamçıların hareketleri, dıştaki mikrotübül çiftlerinin birbirine göreli olarak kaymasının sonucudur ve bu aksonemal dineinin motor aktivitesi ile desteklenir (Şekil 11.56). Dineinin alt kısmı A tübülüne bağlanırken, dinein baş grupları komşu mikrotübül çiftlerinin B tübüllerine bağlanır. Böylece, dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki hareketi, bir çift içindeki A tübülünün, komşu B tübülünün alt ucuna doğru kaymasına yol açar. Aksonemdeki mikrotübül çiftleri neksin köprüleri ile bağlı olduğundan, bir çiftin diğeri üzerinde kayması bükülmelerine neden olur. Bu da kirpik ve kamçının titreşim hareketinin esasını oluşturmaktadır. Buna karşın, aksonemin farklı bölgelerindeki dinein moleküllerinin aktiviteleri, kirpiklerin titreşimlerinin ve kamçının şu ana kadar çok az anlaşılan dalga benzeri hareketlerinin, düzenli olarak gerçekleştirilebilmesi için çok dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir.



Şekil 11.55 Bazal cisimlerin elektron mikroskop fotoğrafları
(A) Bazal cisimlere tutunan kirpiklerin uzunlamasına görünüşü. (B) Bazal cisimlerin enine kesiti. Her bir bazal cisim, dokuz mikrotübül üçlüsüne sahiptir (A, Conly L. Reider/ Biological Photo Service; B, W.L. Dentler, Biological Photo Service).

Şekil 11.56 Kirpik ve kamçı içerisindeki mikrotübüllerin hareketi
Dinein kollarının alt bölümleri A tübüllerine bağlıdır ve motor baş grupları yanlardaki B tübülleri ile etkileşir. Dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki (kirpiğin aşağısına doğru) hareketi, bir çiftteki A tübülünün yandaki B tübülünün aşağısına doğru kaymasına neden olur. Her iki mikrotübül çifti, neksin bağıyla bağlantılı olduğundan kayma hareketi eğilmelerine yol açar.



ANAHTAR SÖZCÜKLER

aktin, mikrofilaman, G aktin, F aktin, yürüme, sitokalasin, falloidin, aktin-bağlayan protein, ARP2/3 kompleksi, ADF/kofilin, profilin

aktin demeti, aktin ağı, aktin-demetleyici protein, fimbrin, kasılabilir demet, α-aktinin, filamin

hücre korteksi, spektrin, ankrin, fodrin, ERM proteinleri, distrofin, integrin, fokal adezyon, stres lifi, talin, vinkulin, aterens bağlantı, adezyon kemeri, kaderin, kateninler

mikrovillus, fırça kenar, stereo-sil, villin, yalancı ayak, lamellipodia, mikro-diken, filopodyum

miyozin, moleküler motor, kas lifi, miyofibril, sarkomer, titin, nebulin, kayan filaman modeli, miyozin II, sarkoplazmik retikulum, tropomiyozin, troponin

ÖZET

AKTİN FİLAMANLARININ YAPI VE ORGANİZASYONU

Aktin Filamanlarının Yapılanması ve Ayrışması: Aktin filamanları aktin monomerlerinin baştan-kuyruğa heliks yapısı meydana getirmek üzere polimerizasyonu ile oluşur. Hücrede aktin-bağlayan çeşitli proteinler aktin filamanlarının yapılanması ve ayrışmasını düzenlemektedir.

Aktin Filamanlarının Organizasyonu: Aktin filamanları, demetler ya da üç boyutlu ağ oluşturmak üzere aktin bağlayan proteinler ile çapraz bağlıdır.

Aktin Filamanlarının Plazma Zarı ile Bağlantıları: Plazma zarının altında aktin filaman ağı ve diğer hücre iskeleti proteinleri yer almaktadır ve bunlar hücrenin şeklini belirler. Plazma zarına, aktin demetleri de bağlanır ve hücre-hücre ve hücre-yüzey noktalarında hücreyi tutar.

Hücre Yüzey Çıkıntıları: Aktin filamanları mikroviluslar gibi hücre yüzeyinden, kalıcı çıkıntı benzeri yapıları ve fagositoz ve hücre yer değişikliklerinden sorumlu geçici uzantıları destekler.

AKTİN, MİYOZİN VE HÜCRE HAREKETİ

Kas Kasılması: Kas üzerine gerçekleştirilen çalışmalar, miyozinin kuvvet ve hareket sağlamak üzere ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan, bir motor protein olduğunu gösterdi. Kas kasılması aktin ve miyozin filamanlarının birbirlerinin üzerinde kayması sonucu gerçekleşir. ATP hidrolizi, miyozin ve aktin arasında tekrarlayan döngüler halinde etkileşimlere yol açar. Bu etkileşimler sırasında, miyozin baş gruplarının aktin filamanları boyunca hareketinden dolayı, konformasyonel değişiklikler gözlenir.

Aktin ve Miyozinin Kas Dışı Hücrelerde Kasılabilir Yapılanmaları: Aktin ve miyozin II'nin birleşmesi, kas dışı hücrelerin sitokinez dahil olmak üzere çeşitli hareket tiplerinden sorumludur.

sitokinez, kasılan halka, miyozin hafif zincir kinaz, kalmodulin

Sıra Dışı Miyozin: Kasılmada görevli olmayan diğer tip miyozinler, zar vezikülleri ve organellerin aktin filamanları boyunca taşınımında rol oynar.

miyozin I

Hücre Göçü ve Sürünme Hareketi: Hücre göçü, hücrenin önde giden bölümünde aktin filamanlarının polimerizasyonu sonucu meydana gelen uzantıların oluştuğu, karmaşık bir olaydır. Bu uzantılar daha sonra yüzeye tutunur ve hücrenin gerideki bölümü kasılarak gövdeye yaklaşır.

ARA FİLAMANLAR

Ara Filaman Proteinler: Ara filamanlar, çeşitli hücre tiplerinde eksprese olan, 50'den fazla farklı protein polimerlerdir. Hücre hareketinde rol oynamazlar, fakat hücre ve dokular için mekanik destek sağlarlar.

ara filamanlar, keratin, sert keratin, yumuşak keratin, vimentin, desmin, nörofilaman (NF) protein

Ara Filamanların Yapılanması: Ara filamanlar, iki polipeptid zincirinin birbiri etrafında dönen sarmal şeklinde dolanması ile oluşan dimerlerden meydana gelir. İkililer daha sonra dörtlüleri ve bunlar da protofilamanları oluşturur. Ara filamanlar ise ip benzeri bir yapı halinde birbiri etrafında dolanan protofilamanlardan oluşur.

Ara Filamanların Hücre İçi Düzenlenmesi: Ara filamanlar birçok hücre tipinde nükleus çevresindeki halka yapısından plazma zarına doğru çıkan ağ yapısı oluşturur. Epitelyal hücrelerde, ara filamanlar hücre zarına desmozom ve hemi-desmozom adı verilen özelleşmiş hücre bağlantı noktalarından tutunur. Bu filamanlar aynı zamanda kas ve sinir hücrelerinde özelleşmiş rollere sahiptir.

desmozom, hemidesmozom, plakin

Keratinlerin ve Nörofilamanların Fonksiyonları: Deri ve Sinir Sistemi Hastalıkları: Ara filamanların, dokulardaki hücrelere mekanik güç sağlamadaki görevi, transgenik farelere mutant keratin geninin aktarılmasıyla gösterilmiştir. Benzer keratin gen mutasyonları bazı insan deri hastalıklarından sorumludur ve nörofilaman anomalileri motor nöron hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır.

EBS
ALS

MİKROTÜBÜLLER

Mikrotübüllerin Yapısı, Yapılanması ve Dinamik Kararsızlığı: Mikrotübüller tubulinin geri-dönüşümlü polimerizasyonu ile oluşur. Dinamik kararsızlık gösterirler ve tübülin polimerizasyonu sonrasında, GTP'nin hidrolizi ile, süregelen birleşme ve ayrışma döngüleri geçirir.

mikrotübül, tübülin, dinamik kararsızlık, kolçisin, kolsemid, vinkristin, vinblastin, taksol

Kolçisin

Sentrozom, Sentriyol ve Mikrotübül Düzenlenmesi: Birçok hücrede mikrotübüller, hücrenin ortasında yerleşmiş olan ve sentrozom adı verilen mikrotübül-düzenleyici merkezden dışarıya doğru uzar. Hayvan hücrelerinde sentrozom genellikle sentriyol çevre maddesi ile çevrili olan bir çift sentriol içerir. Mikrotübüllerin uzaması, daha sonra, eksi uçlarını sabitlemekten sorumlu olan sentriyol çevre maddesi içinden başlar.

mikrotübül düzenleyici merkez, sentrozom, sentriyol, sentriyol çevre maddesi

mitotik iğ, kinetokor mikrotübülü, polar mikrotübül, yıldızsı mikrotübül

mikrotübül-bağlayacı protein (MAP)

Mitoz Sırasında Mikrotübüllerin Yeniden Düzenlenmesi: Mikrotübüller mitozun başlangıcında, kromozom ayrışmasından sorumlu olan mitotik iği oluşturmak üzere, yeniden düzenlenirler.

Mikrotübüllerin Kararlılığı ve Hücre Polaritesi: Mikrotübül ilişkili proteinler tarafından mikrotübüllerin seçici stabilizasyonu, sinir hücresi akson ve dentrit uzantıları gibi, hücre şekil ve polaritesini belirler.

MİKROTÜBÜL MOTORLARI VE HAREKET

kinezin, dinein, aksonemal dinein, video ile desteklenmiş mikroskopi, sitoplazmik dinein

Mikrotübül Motor Proteinlerinin Tanımlanması: İki çeşit motor protein ailesi olan kinezinler ve dineinler mikrotübüller boyunca gerçekleşen hücre hareketinden sorumludur. Kinezin ve birçok kinezin ilişkili proteinler mikrotübülün artı ucuna, dinein ve kinezin ailesinin bazı üyeleri ise eksi uca doğru hareket ederler.

Organel Taşınması ve Hücre İçi Düzenlenme: Mikrotübüller boyunca hareket, sitoplazmik organellerin hücre içinde yerleşmesinin yanı sıra sitoplazma içerisinde zar vezikülleri ve organelleri de taşır.

anafaz A, anafaz B

Mitotik Kromozomların Ayrılması: Mitozun anafaz aşamasında, kardeş kromatidler ayrılır ve mitotik iğin zıt kutuplarına hareket ederler. Kromozom ayrılması, farklı iğ mikrotübül sınıfları ve motor proteinlerin katılım gösterdiği, çeşitli hareket tipleri sonucunda gerçekleşir.

kirpik, kamçı, aksonem, neksin, bazal cisim

Kirpikler ve Kamçılar: Kirpikler ve kamçılar plazma zarının mikrotübül kökenli çıkıntılarıdır. Hareketleri mikrotübüllerin dinein motorlarının davranışları ile desteklenen kaymanın bir sonucudur.

Sorular

1. Aktin filamanlarına artı ve eksi uç oluşturan farklı polariteyi sağlayan nedir?

2. Yürüme nedir ve hangi monomerler yoğunluğunda oluşur?

3. Sitokalasin ve falloidinin, yürüyen aktin filamanları üzerine etkilerini karşılaştırın.

4. Aktin-bağlayıcı proteinler kofilin, profilin ve Arp2/3 aktin filamanlarının yapılanmasını ve dönüşümünü nasıl düzenler?

5. Beş yaşındaki bir erkek çocuk son zamanlarda başlayan kas güçsüzlüğü ile kliniğinize başvurdu, bu hastalığın genetik geçişli olduğunu ve annesinin ailesinden geçtiğini saptadınız. Olası tanınız ve hastalığın nedeni nedir?

6. Kas sarkomerlerinin hangi bandı ya da bölgesinin kasılma sırasında uzunluğu değişir? A bandının uzunluğu neden değişmez?

7. Aktin filamanlarının polaritesi kas kasılmasında neden önemlidir?

8. Sarkoplazmik retikulundan Ca^{2+} salınımı, çizgili kas kasılmasını nasıl sağlar?

9. Keratin genlerindeki mutasyonların fibroblastları etkilemesini bekler misiniz?

10. Kinezin ve miyozin II hangi açılardan benzer, hangi açılardan farklıdır?

11. Neksinin uzaklaştırılması kirpik hareketlerini nasıl etkiler?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Genel Kaynaklar

Bray, D. 2001. *Cell Movements*, 2nd ed., New York: Garland Publishing.

Aktin Flamalarının Yapısı ve Organizasyonu

Bamburg, J. R. and O. P. Wiggan. 2002. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 12: 598-605. [R]

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:27-66. [R]

Campbell, K. P. 1995. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679. [R]

Chen, L. F., H. Winkler, M. K. Reedy, M. C. Reedy and K. A. Taylor. 2002. Molecular modeling of averaged rigor crossbridges from tomograms of insect flight muscle. *J. Struct. Biol.* 138(1-2): 92-104.

Cooper, J. A., M. A. Wear and A. M. Weaver. 2001. Arp2/3 complex: advances on the inner workings of a molecular machine. *Cell* 107:703-705. [R]

Dawe, H. R., L. S. Minamide, J. R. Bamburg and L. P. Gramer. 2003. ADF/Cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol.* 13:252-257. [P]

Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44-49. [P]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic Structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37-44. [P]

Luna, E. J. and A. L. Hitt. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258: 955-964. [R]

Machesky L. M., S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove and T. D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127: 107-115.[P]

Pollard, T. D., S. Almo, S. Quirk, V. Vinson and E. E. Lattman. 1994. Structure of actin binding proteins: Insights about function at atomic resolution. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 207-249. [R]

Schmidt, A. and M. N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 305-338. [R]

Winder, S. J. 2003. Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:14-22. [R]

Yap, A. S., W. M. Brieher and B. M. Gumbiner. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:119-146. [R]

Aktin, Miyozin ve Hücre Hareketi

Chou, Y. H., B. T. Helfand and R. D. Goldman. 2001. New horizons in cytoskeletal dynamics: Transport of intermediate filaments along microtubule tracks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 106-109. [R]

Erickson, H. P. 1997. Stretching single protein molecules: Titin is a weird spring. *Science* 276:1090-1092. [R]

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368:113-119. [P]

Geeves, M. A. and K. C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 687-728. [R]

Goldman, Y. E. 1998. Wag the tail: Structural dynamics of actomyosin. *Cell* 93:1-4. [R]

Higuchi, H. and S. A. Endow. 2002. Directionality and processivity of molecular motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 50-57. [R]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164:1356-1366. [R]

Huxley, H. E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173:973-976. [P]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973. [P]

Pantaloni, D., C. Le Clainche and M. F. Carlier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science* 292:1502-1506. [R]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50-58. [P]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58-65. [P]

Ruppel, K. M. and J. A. Spudich. 1996. Structure-function analysis of the motor domain of myosin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 543-573. [R]

Small, J. V., T. Stradal, E. Vignal and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: Where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12:112-120. [R]

Tan, J. L., S. Ravid and J. A. Spudich. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 721-759. [R]

Trinick, J. and L. Tskhovrebova. 1997. Titin: A molecular control freak. *Trends Cell Biol.* 9: 377-380. [R]

Turner, C. E. and M. C. Brown. 2001. Cell motility: ARNO and ARF6 at the cutting edge. *Curr. Biol.* 11: R875-R877. [R]

Zot, A. S. and J. D. Potter. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 535-559. [R]

Ara Filamanlar

Bonifas, J. M., A. L. Rothman and E. H. Epstein, Jr. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254:1202-1205. [P]

Brown, R. H., Jr. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis: Recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 80: 687-692. [R]

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301-1311. [P]

Coulombe, P. A. and M. B. Omary 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:110-122. [R]

Fuchs, E. and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279: 514-519. [R]

Fuchs, E. and Y. Yang. 1999. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 98:547-550. [R]

Fuchs, E. and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3: 199-209. [R]

Schwarz, M. A., K. Owaribe, J. Kartenbeck and W. W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:461-491. [R]

Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365-380. [P]

Mikrotübüller

Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:25-34. [R]

Cassimeris, L. 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:18-24. [R]

Desai, A. and T. J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 83-117. [R]

Drewes, G., A. Ebneth and E.-M. Martdelkow. 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* 23: 307-311. [R]

Hays, T. and M. Li. 2001. Kinesin transport: driving kinesin in the neuron. *Curr. Biol.* 11: R136-R139. [R]

Job, D., O. Valiron and B. Oakley 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 111-117. [R]

Karsenti, E. and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* 294: 543-547. [R]

Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow. 2002. Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 12: 585-591. [R]

Marshall, W. F. 2001. Centrioles take center stage. *Curr. Biol.* 11: R487-R496. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242. [P]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Microtubule assembiy nudeated by isolated centrosomes. *Nature* 312:232-237. [P]

Nogales, E., M. Whittaker, R. A. Milligan and K. H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79-88. [P]

Oakley B. R., C. E. Oakley Y. Yoon and M. K. Jung. 1990. γ-Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61:1289-1301. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867-871. [P]

Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ-tubulin-contaming ring complex. *Nature* 378: 578-583. [P]

Mikrotübül Motorları ve Hareket

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73-75. [P]

Brady, S. T, R. J. Lasek and R. D. Allen. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129-1131.[P]

Desai, A., S. Verma, T. J. Mitchison ana C. E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96: 69-78. [P]

Gibbons, I. R. 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91:107s-124s. [R]

Gibbons, I. R., and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149:424-426. [P]

Lasek, R. J. and S. T. Brady 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316:645-647. [P]

Rieder, C. L. and E. D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8: 310-318. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5:154-157. [R]

Saunders, W. S. 1993. Mitotic spindle pole separation. *Trends Cell Biol.* 3:432-437. [R]

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50. [P]

Vallee, R. B. and M. P. Sheetz. 1996. Targeting of motor proteins. *Science* 271: 1539-1544.

Bölüm 12 Hücre Yüzeyi

Plazma Zarının Yapısı 483

Küçük Moleküllerin Taşınması 494

Endositoz 510

Hücre Duvarları ve Hücre Dışı Matris 518

Hücre-Hücre Etkileşimleri 528

ANAHTAR DENEY: LDL Reseptörü 512

MOLEKÜLER TIP: Kistik Fibrozis 509

TÜM HÜCRELER- PROKARYOT ve ÖKARYOT- hücrenin sınırlarını belirleyen ve içeriğini dış çevreden ayıran bir plazma zarıyla kuşatılmışlardır. Plazma zarı moleküllerin geçişine seçici bir engel oluşturarak sitoplazmanın bileşimini belirler. Bu, sonuç olarak hücrenin kendisine ait kimliğini belirlediği için, plazma zarı hücre evriminde en önemli yapılardan biridir. Gerçekten, Bölüm 1'de tartışıldığı gibi ilk hücrenin, kendi başına replike olabilen RNA'nın bir fosfolipid zarla çevrilmesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

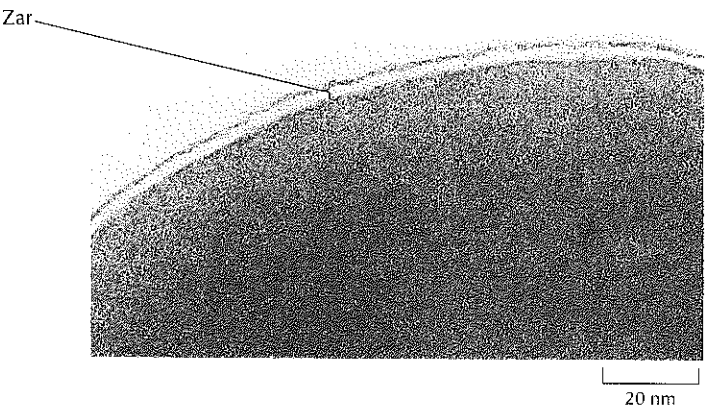
Günümüz hücrelerinin plazma zarları lipid ve proteinlerden oluşmaktadır. Plazma zarının esas yapısı, suda- çözünen molekülleri geçirmeyen bir fosfolipid çift tabakasıdır. Bu nedenle, iyonların ve bir çok biyolojik molekülün plazma zarından geçişleri, moleküllerin hücre içine ve dışına seçili trafiğinden sorumlu olan proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Plazma zarındaki diğer proteinler, çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki etkileşimleri denetler ve çevreden gelen sinyallerin alındığı algılayıcılar olarak görev yaparlar. Böylece plazma zarı ikili rol oynar: Bir yandan sitoplazmayı izole ederken diğer yandan hücre ile çevresi arasında etkileşimi sağlar.

Plazma Zarının Yapısı

Diğer tüm hücresel zarlar gibi plazma zarı da lipidler ile proteinlerden oluşur. Zarın ana yapısı, iki, sulu ortam arasında sağlam bir engel oluşturan bir fosfolipid çift tabakasıdır. Plazma zarı göz önüne alındığında bu iki bölme hücrenin içi ile dışıdır. Fosfolipid çift tabakasına gömülü olan proteinler plazma zarının, seçili molekül taşıma ve hücre-hücre tanıma gibi özel işlevlerini yerine getirir.

Fosfolipid Çift Tabaka

Plazma zarı tüm hücresel zarlar arasında en detaylı çalışılmış olandır ve bu, çoğunlukla, güncel zar yapısı kavramlarımızı geliştirdiğimiz plazma zarının incelenmesi yoluyla sağlanmıştır. Memeli kırmızı kan

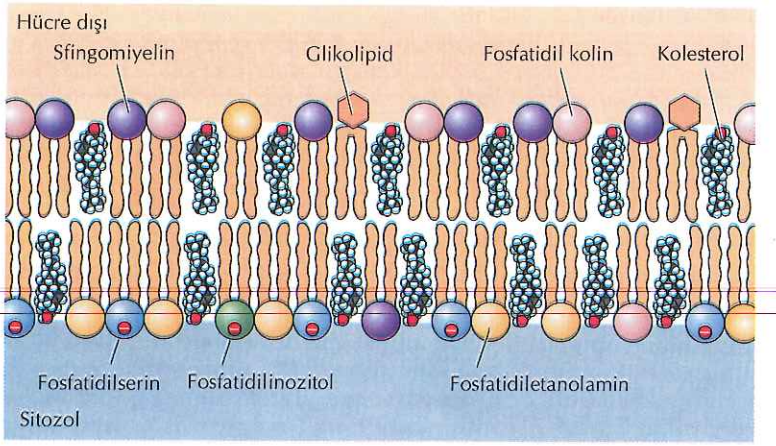


Şekil 12.1 Plazma zarının çift tabaka yapısı
İnsan kırmızı kan hücresinin elektron mikroskop görüntüsü. Plazma zarının tren yolu rayı görüntüsüne dikkat edin. (J.David Robertson'un katkısı, Duke University Medical Center)

hücrelerinin (eritrosit) plazma zarları, zar yapısının incelenmesinde model olarak özellikle yararlı olmuştur. Memeli kırmızı kan hücreleri nükleus ve iç zarlara sahip olmadıklarından, biyokimyasal analiz için saf plazma zarlarının izole edilebileceği bir kaynak oluştururlar. Gerçekten de, kırmızı kan hücresi plazma zarının incelenmesi, biyolojik zarların lipid çift tabakasından oluştuğunun ilk kanıtını sağlamıştır. Hollanda'lı iki bilim adamı (E. Gorter ve R. Grendel) 1925'de, plazma zarının bilinen yüzey alanına eşdeğer belli sayıda kırmızı kan hücresinden zar lipidlerini elde ettiler. Daha sonra, elde edilen lipidin, bir hava-su ara yüzeyinde tek katman halinde yayılımının kapladığı yüzey alanını saptadılar. Lipid tek tabakasının yüzey alanının, eritrosit plazma zarının kapladığının iki katı olduğu anlaşılınca, zarların lipid tek tabakasından değil çift tabakasından oluştuğu sonucuna varıldı.

Eritrosit plazma zarının çift tabaka yapısı, yüksek- büyütmeli elektron mikroskop görüntülerinde açık olarak görülür (Şekil 12.1). Plazma zarı, bir ara bölge ile ayrılan iki yoğun hat– genellikle, "tren yolu rayı" olarak adlandırılan bir yapıda görünmektedir. Bu görüntü, transmisyon elektron mikroskopisinde boya olarak kullanılan (bkz. Bölüm 1) elektron-yoğun ağır metallerin, fosfolipidlerin polar gruplarına bağlanması ve bunların karanlık hatlar şeklinde belirmesinin sonucudur. Yoğun çizgiler, zarın, açık boyanan ve hidrofobik yağ asidi zincirlerini içeren iç bölümüyle birbirinden ayrılır.

Bölüm 2'de anlatıldığı gibi, hayvan hücrelerinin plazma zarları dört büyük fosfolipid içerir **(fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve sfingomiyelin),** ki bunların toplamı, çoğu zarların yapısında bulunan lipidlerin yarısından fazlasına denktir. Fosfolipidler çift zar tabakasının iki yarısına asimetrik olarak dağılırlar (Şekil 12.2). Plazma zarının dış yaprağı esas olarak fosfatidilkolin ve sfingomiyelinden oluşur, buna karşın fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin iç yaprakta baskın olan fosfolipidlerdir. **Fosfatidilinositol** beşinci fosfolipid olarak plazma zarının içteki yarısında yer alır. Fosfatidilinositol zarda göreli olarak az bulunan bir bileşik olmasına karşın, bir sonraki bölümde anlatıldığı gibi, hücre sinyal iletiminde önemli rol oynar. Fosfatidilserin ve fosfatidilinositolün her ikisinin de baş grupları negatif yüklü olduğundan, iç yaprakta fazla bulunmaları plazma zarının sitozole bakan yüzünde net negatif yük nedenidir.



Şekil 12.2 Plazma zarının lipid bileşenleri
Dış yaprak baskın olarak fosfatidilkolin, sfingomiyelin ve glikolipidler içerirken iç yaprak fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinositol içerir. Kolesterol her iki yaprağa da dağılmıştır. Fosfatidilserin ve fosfatidilinositol baş gruplarının net negatif yükü belirtilmiştir. Fosfolipidlerin, glikolipidlerin ve kolesterolün yapıları Şekil 2.7, 2.8 ve 2.9'da görülmektedir.

Hayvan hücrelerinin plazma zarları fosfolipidlere ek olarak **glikolipidler ve kolesterol** de içerirler. Glikolipidler, plazma zarında yalnızca dış yaprakta ve karbohidrat kısımları hücre yüzeyinde açıkta olacak şekilde bulunurlar. Plazma zarı lipidlerinin sadece %2'sini oluşturan, göreli olarak az bulunan zar bileşenleridir. Diğer yandan kolesterol, hayvan hücrelerinde fosfolipidlerle yaklaşık olarak aynı molar miktarda bulunan majör bir zar bileşenidir.

Fosfolipid çift tabakalarının iki genel özelliği zar işlevi yönünden çok önemlidir. İlk olarak, fosfolipidlerin yapısı, zarların iki, sulu ortam arasında engel oluşturma temel işlevinden sorumludur. Fosfolipid çift tabakasının iç kısmı hidrofobik yağ asidi zincirleriyle dolu olduğu için, zar, iyonlar ve bir çok biyolojik molekül dahil suda çözünen molekülleri geçirmez. İkinci olarak, doğada var olan fosfolipidlerin oluşturduğu çift-tabakalar katı değil koyu akışkandırlar. Doğal fosfolipidlerin çoğunun yapısındaki yağ asitleri bir veya daha fazla çift bağ içerirler ve hidrokarbon zincirlerinde, bir araya paketlenmelerini güçleştiren kıvrılmalara neden olurlar. Bu nedenle yağ asitlerinin uzun hidrokarbon zincirleri zar içerisinde serbestçe hareket ederek zara yumuşaklık ve esneklik kazandırırlar. Ayrıca, hem fosfolipidler hem de proteinler zar içerisinde yana doğru serbestçe difüze olabilirler- bir çok zar işlevi için çok önemli bir özellik.

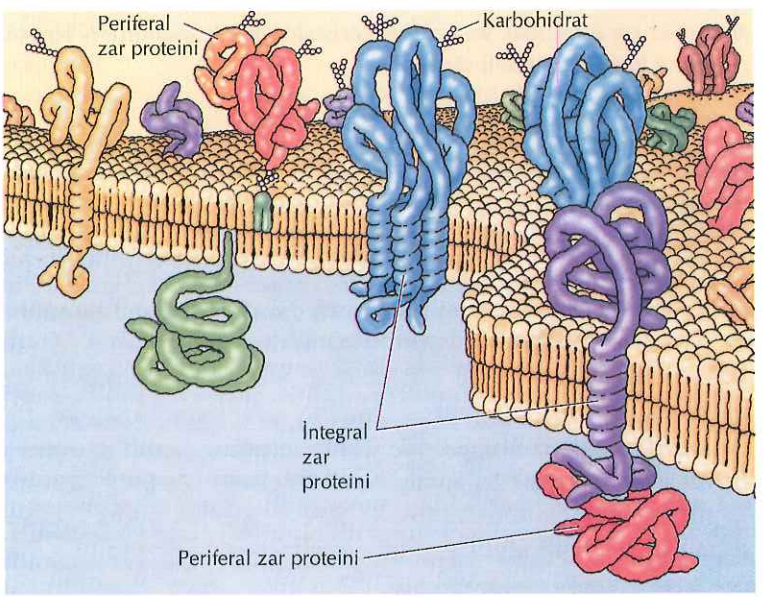
Katı halka yapısından dolayı kolesterol, zar yapısında farklı bir rol oynar. Kolesterol kendi başına bir zar oluşturmaz, ancak, polar hidroksil grubu fosfolipid baş gruplarına yakın gelecek şekilde fosfolipid çift tabakası içerisine yerleşir (bkz. Şekil 12.2). Sıcaklığa bağlı olarak kolesterolün zar akışkanlığı üzerindeki etkisi farklılaşır. Yüksek sıcaklıklarda, kolesterol fosfolipid yağ asidi zincirlerinin hareketini engelleyerek zarın dış kısmını daha az akışkan hale getirir ve küçük moleküllere geçirgenliğini azaltır. Buna karşın düşük sıcaklıklarda, kolesterol zıt etki gösterir: yağ asidi zincirlerinin bir araya gelmelerini engelleyerek zarların donmasını önler ve zar akışkanlığını korur. Bakterilerde bulunmamasına karşın kolesterol hayvan hücresi plazma zarlarının önemli bir bileşenidir. Bitki hücreleri de kolesterolden yoksundur ancak, benzer işlevleri yerine getiren yakın bileşenler (steroller) içerirler.

Son çalışmalar, tüm lipidlerin plazma zarında serbestçe difüze olmadıklarını göstermektedir. Gerçekten de, belirgin zar alanlarının kolesterol ve sfingolipidlerden (sfingomiyelin ve glikolipidler) zengin oldukları görülmektedir. Bu kolesterol ve sfingolipid kümelerinin, plazma zarı içerisinde yanlara doğru hareket eden ve özgün zar proteinleriyle ilişkiye giren "sallar" oluşturdukları düşünülmektedir. Lipid salların işlevleri henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, bu bölümde daha sonra anlatılacağı gibi, hücre sinyal iletimi ve hücre dışı moleküllerin alınması gibi süreçlerde önemli roller oynuyor olabilirler.

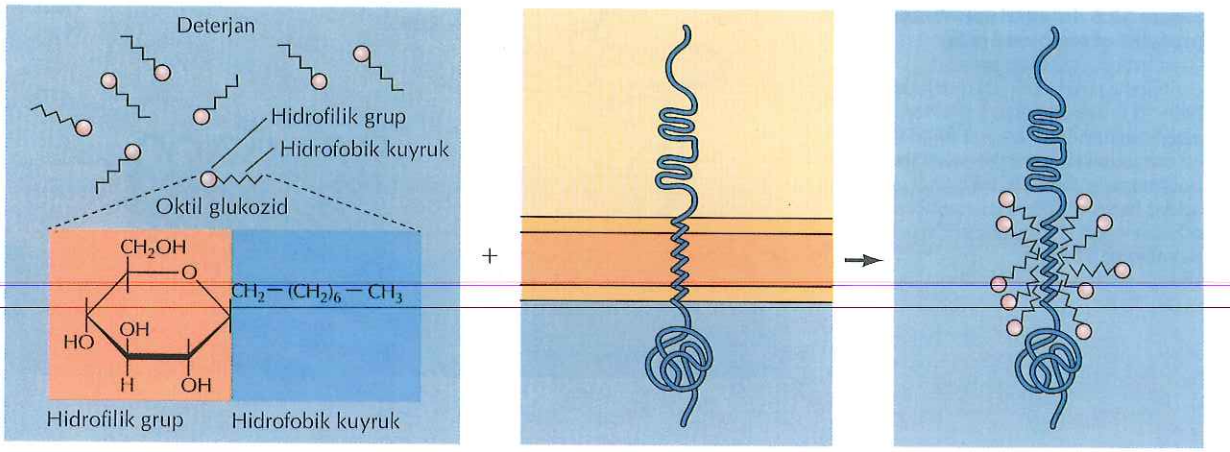
Zar Proteinleri

Lipidler zarların temel yapısal elemanları iken, proteinler özel zar işlevlerini yürütmekle görevlidirler. Plazma zarlarının çoğu ağırlık olarak %50 lipid ve %50 proteinden oluşurlar, glikolipid ve glikoproteinlerin karbohidrat kısımları ise zar kütlesinin %5 ila 10'unu oluşturur. Proteinler lipidlere kıyasla çok daha büyük olduklarından bu oran, yaklaşık her 50 ila 100 lipid molekülüne karşılık bir protein molekülüne denktir. Jonathan Singer ve Garth Nicolson 1972'de, bugün tüm biyolojik zarların organizasyonu için temel paradigma kabul edilen, zar yapısının **akışkan mozaik modelini** önermişlerdir. Bu modelde zarlar, lipid çift tabakası içine proteinlerin yerleştiği iki-boyutlu bir akışkan olarak görülür (Şekil 12.3).

Singer ve Nicholson zarla-ilişkili proteinleri iki sınıfta tanımladılar, bunları **periferal** ve **integral** zar proteinleri olarak adlandırdılar. Periferal zar proteinleri işlemsel olarak, fosfolipid çift tabaka yapısını bozmayan, aşırı pH ya da yüksek tuz konsantrasyonu gibi polar ajanlarla işlemlemeyi takiben zardan ayrılan proteinler olarak tanımlandılar. Bir kez zardan ayrılan periferal zar proteinleri sulu tamponlarda çözünürler. Bu proteinler lipid çift tabakasının hidrofobik



Şekil 12.3 Plazma zarının akışkan mozaik modeli
İntegral zar proteinleri lipid çift tabakasının içine yerleşirken periferal proteinler zara protein- protein ilişkileriyle, dolaylı olarak bağlanırlar. İntegral proteinlerin çoğu, lipid çift tabakasının iki yanında açık kısımları bulunan transmembran proteinlerdir. Bu proteinlerin hücre dışında kalan kısımları, zarın dış yüzüne bağlanan periferal zar proteinlerde de olduğu gibi, genellikle glikozillenmişlerdir.



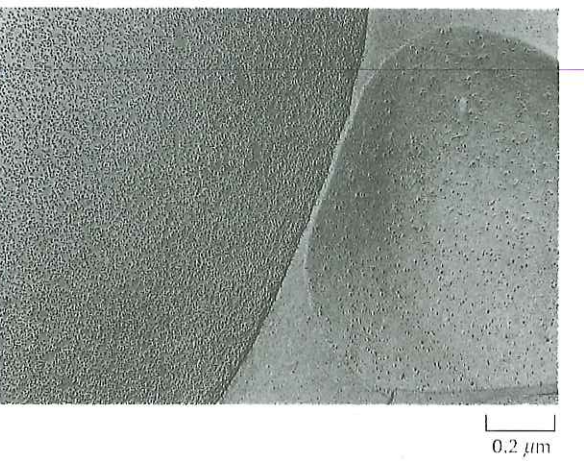
Şekil 12.4 İntegral zar proteinlerinin deterjanlarla çözünmesi
Deterjanlar (örn., oktil glukozid), hidrofilik baş kısmı ve hidrofobik kuyruklara sahip amfipatik moleküllerdir. Hidrofobik kuyruklar integral zar proteinlerinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak, sulu çözeltilerde çözünen deterjan- protein kompleksleri oluştururlar.

iç kısmına girmezler. Bunun yerine, protein- protein etkileşimleriyle zara dolaylı şekilde bağlanırlar. Bu bağlantılar çoğunlukla, aşırı pH ve yüksek tuzlarla bozulan iyonik bağlarla olur.

Periferal zar proteinlerinin aksine, integral zar proteinleri ancak fosfolipid çift tabakasını bozan işlemlerle serbestleşebilirler. Bu integral zar proteinlerinin bir kısmı lipid çift tabakası içerisine girdiğinden, sadece hidrofobik etkileşimleri bozan ajanlarla ayrılabilirler. İntegral zar proteinlerinin çözünmesi için en çok kullanılan ajanlar, hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplara sahip küçük amfipatik moleküller olan deterjanlardır (Şekil 12.4). Deterjanların hidrofobik kısımları zar lipidlerini uzaklaştırarak integral zar proteinlerinin hidrofobik kısımlarına bağlanırlar. Deterjan molekülünün diğer ucu hidrofilik olduğundan, deterjan-protein kompleksleri sulu çözeltilerde çözünürler.

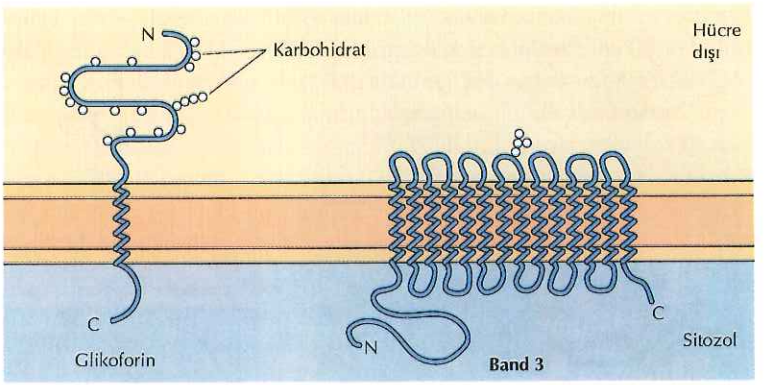
İntegral proteinlerin çoğu, zarın her iki yanında açık kısımları bulunacak şekilde lipid çift tabakasını kat eden **transmembran proteinler**dir. Bu proteinler, dondurup-çatlatma (freeze-fracture) yöntemiyle (bkz. Şekil 1.36) hazırlanan plazma zarlarının elektron mikroskop görüntülerinde izlenebilmektedir. Bu örneklerde zar yarılarak iki yaprak halinde ayrılır. Transmembran proteinler böylece, zarın iç yüzlerinde zerrecikler şeklinde görülür (Şekil 12.5).

Şekil 12.5 İnsan kırmızı kan hücresi zarlarının dondurup-çatlatma (freeze-fracture) yöntemiyle elektron mikroskop görüntüsü
Zardaki zerrecikler transmembran proteinlerdir. (Harold H. Edwards/Visuals Unlimited)



Transmembran proteinlerin zarı kat eden kısımları genellikle, 20 ila 25 hidrofobik amino asit içeren α sarmallardır, bunlar polipeptid zincirinin sentezi sırasında endoplazmik retikulum zarının içine yerleşirler (bkz. Şekil 9.11, 9.12 ve 9.13). Bu proteinler daha sonra zar kesecikleriyle endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına ve oradan da plazma zarına taşınırlar. Karbohidrat grupları polipeptid zincirlerine hem endoplazmik retikulumda hem de Golgi aygıtında eklenir, böylece, plazma zarındaki transmembran proteinlerin çoğu, oligosakkaridleri hücre yüzeyinde açık olan glikoproteinlerdir.

Kırmızı kan hücreleriyle yapılan çalışmalar, plazma zarına bağlı integral ve periferal proteinlere ait güzel



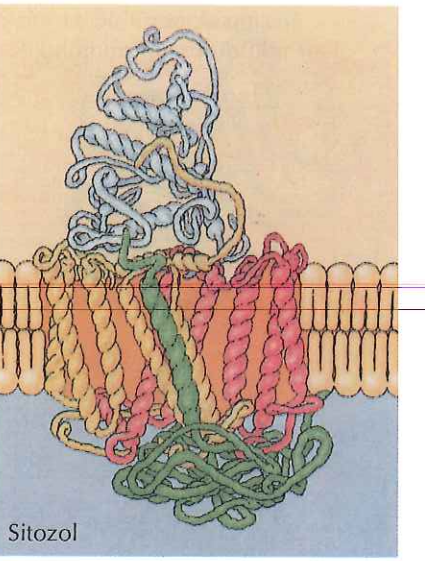
Şekil 12.6 Kırmızı kan hücrelerinin integral zar proteinleri
Glikoforin (131 amino asit) tek transmembran α sarmal içerir. Polipeptid zincirinin hücre dışında kalan kısmında 16 bölgeye bağlanan oligosakkaridlerle, yoğun biçimde glikozillenmiştir. Band 3 (929 amino asit) çok sayıda transmembran α sarmale sahiptir ve zarı 14 kez geçtiği düşünülmektedir.

örnekler sağlamıştır. İnsan alyuvar zarları, başlangıçta jel elektroforezi ile tanımlanmış olan yaklaşık bir düzine büyük protein içerir. Bunların çoğu, plazma zarının altında yer alan ve hücrenin şeklini belirleyen kortikal hücre iskeletinin (bkz. Bölüm 11) bileşenleri olarak ayrımlanan periferal zar proteinleridir. Örneğin, kırmızı kan hücrelerinde en fazla bulunan periferal protein, alyuvar hücre iskeletinin majör proteini olan spektrindir. Kırmızı kan hücrelerinin diğer periferal zar proteinleri arasında, aktin, ankirin ve band 4.1 bulunur. Ankirin, spektrine ve integral zar proteini band 3'e bağlanarak plazma zarıyla hücre iskeleti arasında ana bağlantı görevi yapar (bkz. Şekil 11.12). Zar ile hücre iskeleti arasındaki diğer bir bağlantı da, spektrin ve aktin kavşağına ve aynı zamanda glikoforine (alyuvarlarda bulunan diğer bir majör integral zar proteini) bağlanan band 4.1 ile sağlanır.

Kırmızı kan hücrelerinin majör integral zar proteinleri olan glikoforin ve band 3, transmembran protein yapısı açısından iyi incelenmiş örneklerdir (Şekil 12.6). Glikoforin, 131 amino asitlik, yaklaşık 30,000 molekül ağırlığında, yarısı protein yarısı karbohidrat olan küçük bir glikoproteindir. Glikoforin, zarı, bir kez kat eden 23 amino asitlik bir α sarmal ile geçer ve glikozillenmiş amino- uç kısmı hücre yüzeyinde ortaya çıkar. Glikoforin ilk tanımlanan transmembran zar proteinlerinden biri olmasına karşın kesin işlevi henüz bilinmemektedir. Bunun aksine, kırmızı kan hücrelerinin diğer majör transmembran zar proteininin işlevi iyi anlaşılmıştır. Başlangıçta band 3 olarak bilinen bu protein, kırmızı kan hücrelerinin zarından bikarbonat (HCO_3^-) ve klorid (Cl^-) iyonlarının geçişinden sorumlu anyon taşıyıcıdır. Band 3 polipeptid zinciri 929 amino asittir ve zarı kat eden 14 α- sarmal bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir. Zarın içinde band 3 dimerleri, içerisinden iyonların lipid çift tabakayı geçebildikleri kanalı bulunan küresel yapılar oluştururlar.

Amfipatik özellikleri nedeniyle transmembran proteinlerin, X-ışını kırılımı (diffraction) yöntemiyle üç- boyutlu yapı analizi için gerekli olan kristalleştirilmeleri oldukça zordur. X-ışını kristallografisi ile incelenen ve yapısı 1985'de yayınlanan ilk transmembran protein,

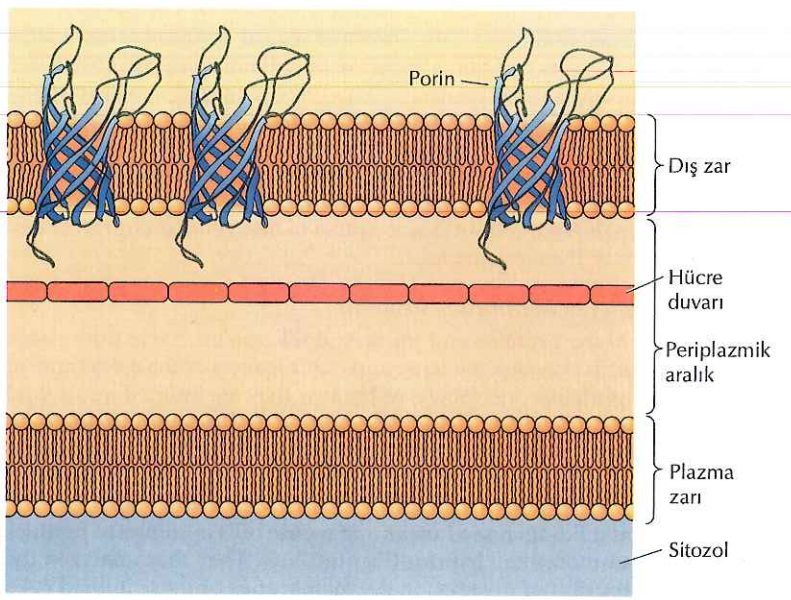
Rhodopseudomanas viridis bakterisinin fotosentetik reaksiyon merkezidir (Şekil 12.7). Reaksiyon merkezi, jel elektroforezi ile belirlenen büyüklüklerine göre, L, M, ve H (hafif, orta ve ağır) olarak adlandırılan üç transmembran protein içerir. L ve M alt birimlerinin her ikisi de, zarı kat eden beş α sarmal içerir. H alt birimi tek bir transmembran α sarmala sahiptir ve polipeptid zincirinin büyük bölümü zarın sitozolik tarafındadır. Reaksiyon merkezinin dördüncü alt birimi, komplekse protein- protein ilişkisiyle bağlı bir periferal zar proteini olan sitokromdur.



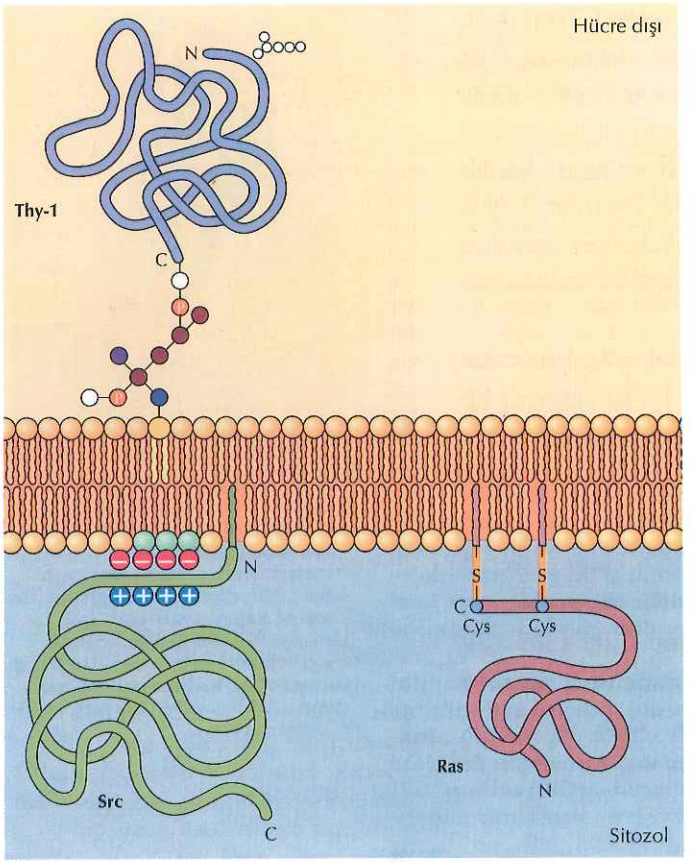
Şekil 12.7 Bakteriye ait fotosentez reaksiyon merkezi
Reaksiyon merkezi, L (kırmızı), M (sarı) ve H (yeşil) olarak belirtilen üç transmembran proteinden oluşur. L ve M beşer transmembran α sarmal içerirken H alt birimi sadece bir tane içerir. Reaksiyon merkezinin dördüncü alt birimi, bir periferal zar proteini olan sitokromdur (beyaz).

Transmembran proteinlerin çoğu zarı α sarmal bölgeleriyle kat ediyorlarsa da durum her zaman böyle değildir. İyi tanımlanmış bir istisnayı, bazı bakterilerin dış zarlarında kanallar oluşturan bir protein grubu olan **porinler** oluşturur. *E.coli* dahil bir çok bakteri, plazma zarını (ya da iç zar) çevreleyen bir hücre duvarı ile ayrı bir dış zardan ibaret bir, ikili zar sistemine sahiptir (Şekil 12.8). Plazma zarının aksine, dış zar iyonlara ve küçük polar moleküllere (*E.coli* için molekül ağırlığı 600'e kadar olanlar) yüksek oranda geçirgendir. Bu geçirgenliğin nedeni, lipid çift tabakası içerisinde sulu kanallar oluşturan porinlerdir. Bölüm 10'da anlatıldığı gibi, bakteri porinlerine benzer proteinler mitokondri ve kloroplastların dış zarlarında da bulunmaktadır.

Yapısal incelemeler porinlerin hidrofobik α sarmal bölgeleri içermediklerini göstermiştir. Bunun yerine, 8-22 β tabakasının, içinde su geçidi bulunan bir fıçıya benzer şekilde kıvrılarak oluşturdukları, β fıçıları şeklinde zarı kat ederler. Hidrofobik amino asitlerin yan zincirleri zarın iç kısmıyla etkileşirken, polar amino asitlerin yan zincirleri geçidi kaplar. Bazı porinler zarda monomer şeklinde



Şekil 12.8 Bakteri dış zarı
Bazı bakterilerin plazma zarı bir hücre duvarıyla ve farklı bir dış zarla çevrilidir. Dış zar, iyonların ve küçük moleküllerin serbestçe geçişine olanak veren sulu kanallar oluşturan porinleri içerir. Porinler zarı β fıçıları şeklinde kat ederler.



Şekil 12.9 Plazma zarına lipid ve glikolipidlerle tutunan protein örnekleri
Bazı proteinler (örn., lenfosit Thy-1 proteini) plazma zarının dış yaprağına, C uçlarına endoplazmik retikulumda eklenen GPI çapalarıyla tutunurlar. Bu proteinler glikozillenirler ve hücre yüzeyinde sergilenirler. Diğer proteinler, sitoplazmik serbest ribozomlarda sentezlenmelerini takiben, plazma zarının iç yaprağına tutunurlar. Resimde görülen Ras proteini, bir C- ucu sisteininin yan zincirine eklenmiş prenil grubu ve beş amino asit yukarısında bulunan bir sisteine eklenmiş palmitoil aracılığıyla tutunur. Src proteini N ucuna eklenmiş miristoil aracılığıyla bağlanır. Src'nin pozitif yüklü bir bölümü de, olasılıkla fosfatidilserinin negatif yüklü baş kısmıyla ilişkiye girerek, zara bağlanmasında rol oynar. Bu lipid ve glikolipid gruplarının yapıları Şekil 7.31 den 7.34'e kadar resmedilmişlerdir.

bulunurken, diğerleri, içerisinden polar moleküllerin geçebildiği çok sayıda kanal içeren, dayanıklı multimerler oluşturmak üzere bir araya gelirler.

Transmembran proteinlerin aksine çeşitli proteinler (bunların çoğu integral zar proteinleri gibi davranır) plazma zarına kovalent olarak bağlandıkları lipidler ya da glikolipidler aracılığıyla tutunurlar. (Şekil 12.9). Bu proteinlerin bir sınıfının üyeleri plazma zarının dış yaprağına **glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapaları** aracılığıyla tutunur. GPI çapaları, endolazmik retikulumun içine aktarılan ve zara, C-ucu transmembran bölümleri aracılığıyla katılan belirli proteinlere eklenir (bkz. Şekil 9.16). GPI çapası eklenirken transmembran bölge kesilir ve protein zara sadece glikolipid aracılığıyla bağlı kalır. GPI-eklenmiş proteinlerin polipeptid zincirleri endoplazmik retikuluma aktarıldıkları için glikozillenirler ve plazma zarına taşındıklarında hücre yüzeyinde sergilenirler.

Diğer proteinler plazma zarının iç yaprağına, kovalent bağlı lipidler aracılığıyla tutunurlar. Salgı yolağında işlenmek yerine sitoplazmadaki serbest ribozomlarda yapılan bu proteinler daha sonra lipid eklenerek değiştirilirler. Bu değişiklikler; polipeptid zincirinin amino ucuna miristik asit (14 karbonlu bir yağ asidi), sistein birimlerinin yan zincirlerine palmitik asit (16 karbonlu) ve karboksil ucundaki sisteinlerin yan zincirlerine prenil gruplarının (15 veya 20 karbonlu) eklenmesini kapsar (bkz. Şekil 7.31, 7.32 ve 7.33). Bu proteinler (periferal zar proteini gibi davrananların çoğu) plazma zarına, bazı durumlarda, eklenmiş olan lipidin yanı sıra polipeptid zincirinin pozitif yüklü bölgeleriyle de hedeflenirler. Proteinin pozitif yüklü bölümü plazma zarının sitozolik yüzündeki fosfatidilserinlerin negatif yüklü baş bölgelerine bağlanır. Plazma zarının iç yaprağındaki bağlı proteinlerin bir çoğunun (Şekil 12.9'da gösterilen Src ve Ras proteinleri de dahil), bir sonraki bölümde anlatıldığı şekilde, uyarıların hücre yüzeyindeki reseptörlerden hücre içindeki hedeflere iletilmesinde önemli rol oynadıklarını belirtmek gerekir.

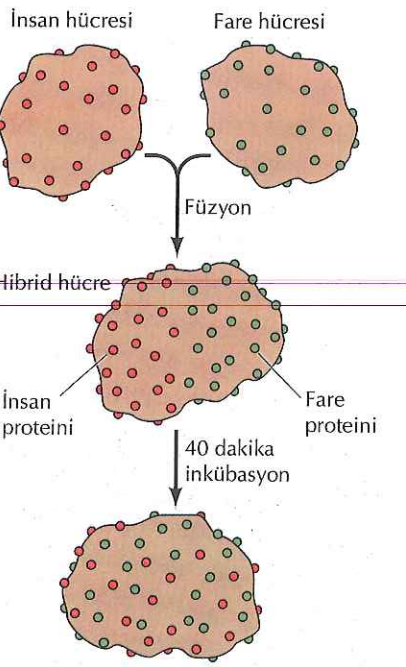
Zar Proteinlerinin Hareketliliği

Zar proteinleri ve fosfolipidleri zarın iç ve dış yaprakları arasında belirgin düzeyde yer değiştirmezler. Ancak, akışkan bir lipid çift tabaka içerisinde bulunduklarından, hem proteinler hem de lipidler zar boyunca yanlara doğru sızabilirler. Bu yana doğru hareket ilk kez 1970'de Larry Frye ve Michael Edidin tarafından yayınlanan ve

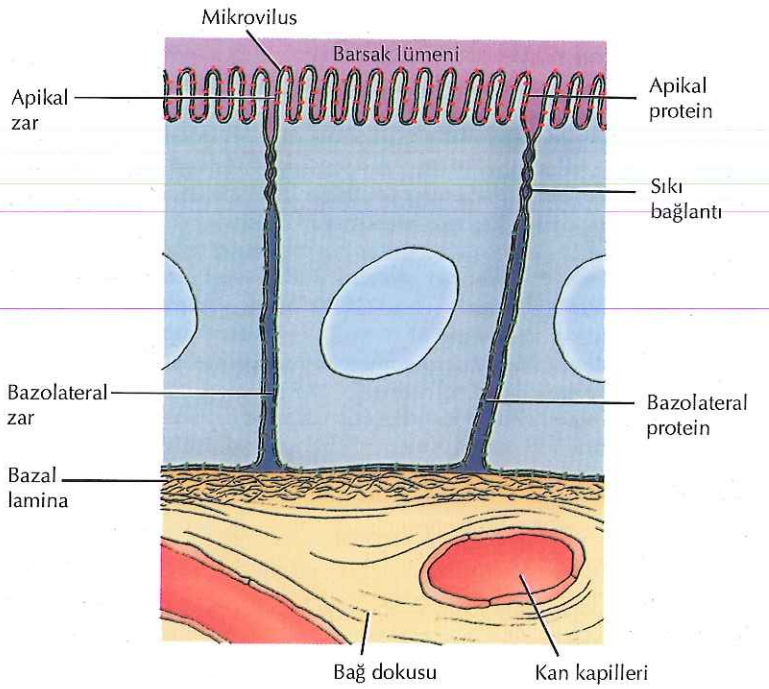
akışkan mozaik zar kavramını destekleyen bir deneyle gösterilmiştir. Frye ve Edidin kültürdeki fare ve insan hücrelerini, insan- fare hücre hibridleri elde etmek üzere birleştirdiler (Şekil 12.10). Daha sonra bu hibrid hücrelerin zarlarındaki proteinlerin dağılımını, insan ve fare kökenli proteinleri spesifik olarak tanıyan antikorlar kullanarak incelediler. İnsan ve fare proteinlerinin floresan mikroskopla ayırt edilebilmesi için antikorlar farklı floresan boyalarla işaretlenmişti. Birleşmenin hemen ardında, insan ve fare proteinleri hibrid hücrelerin farklı yarısında bulunmaktaydı. Ancak, 37°C'da kısa bir inkübasyondan sonra insan ve fare proteinleri, plazma zarında serbestçe hareket ettiklerini gösterir şekilde, hücre yüzeyinde tümüyle birbirine karıştı.

Ancak, tüm proteinler zar içerisinde serbestçe hareket edemezler. Bazı durumlarda zar proteinlerinin hareketi hücre iskeletiyle bağlantıları nedeniyle kısıtlanır. Örneğin, kırmızı kan hücre zarındaki bir band 3 fraksiyonu, ankirin ve spektrinle olan bağlantısı nedeniyle hareketsizleşmiştir. Bunun dışında, zar proteinlerinin hareketleri; zardaki diğer proteinlerle, komşu hücrelerin zarlarındaki proteinlerle ve hücre dışı matrisle bağlantıları nedeniyle kısıtlanabilir.

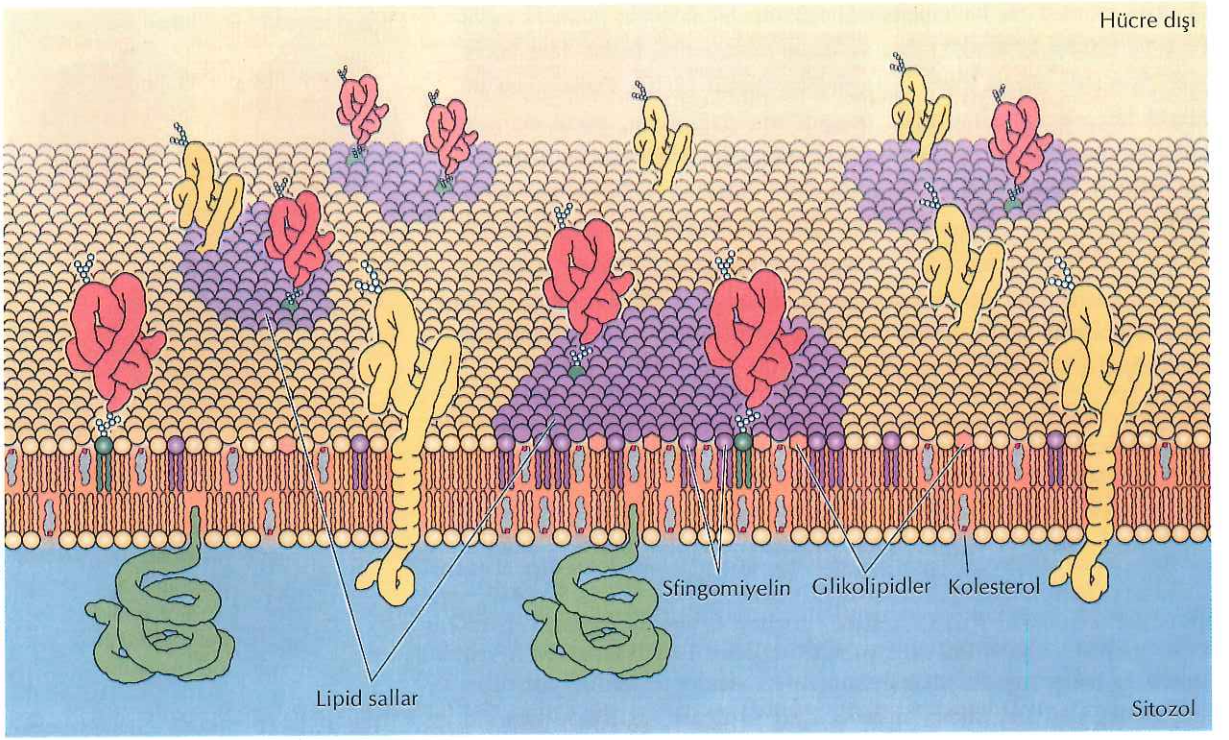
Kan hücrelerinin aksine epitel hücreleri, doku oluşturmak üzere bir araya geldiklerinde, hücrenin farklı bölgeleri farklı işlerden sorumlu olacak şekilde polarize olurlar. Sonuç olarak bir çok epitel hücresinin plazma zarları, işlev ve protein içerik yönünden farklı olan **apikal** ve **bazolateral** bölgelere ayrılmıştır (Şekil 12.11). Örneğin, ince barsak epitel hücreleri sindirim kanalından besinlerin soğurulması işlevini görür. Bu nedenle, bu hücrelerin barsak boşluğuna bakan apikal yüzeyleri besin soğurmak üzere özelleşmiş ve mikroviluslarla kaplanmıştır. Alttaki bağ dokusuna ve kan dolaşımına bakan bazolateral yüzey, soğurulan besinlerin dolaşıma aktarılmasını



Şekil 12.10 Zar proteinlerinin hareketliliği
İnsan ve fare hücreleri hibrid hücreler oluşturmak üzere birleştirildi. Daha sonra hücre yüzey proteinlerinin dağılımı, farklı floresan boyalarla işaretlenmiş anti-insan ve anti- fare (sırasıyla, kırmızı ve yeşil) kullanılarak incelendi. Birleşmeden hemen sonra insan ve fare proteinleri hibrid hücrenin farklı yarılarında, 40 dakikalık inkübasyonu takiben ise, hücre yüzeyinde birbirine karışmış olarak saptandı.



Şekil 12.11 Polarize olmuş bir barsak epitel hücresi
Hücrenin apikal yüzeyi mikroviluslar içerir ve barsak lümeninden besinlerin soğurulması için özelleşmiştir. Hücrenin bazolateral yüzeyi, soğurulan besinleri, kan damarları içeren alttaki bağ dokusuna aktarmak üzere özelleşmiştir. Sıkı bağlantılar plazma zarının apikal ve bazolateral alanlarını birbirinden ayırır. Zar proteinleri her alan içerisinde yayılmakta özgürdür ancak,bir alandan diğerine geçemezler.

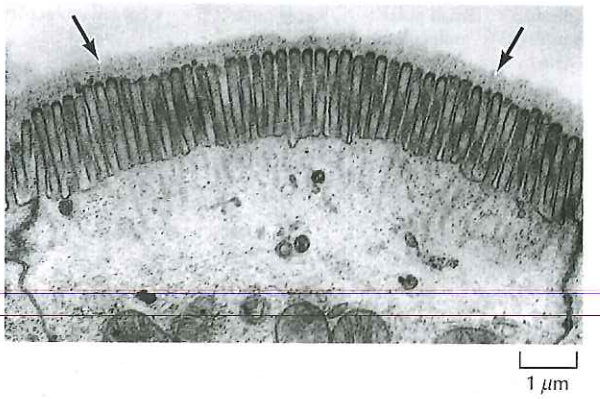


Şekil 12.12 Lipid salların yapısı
Lipid sallar, sfingomiyelin, glikolipid ve kolesterolün etkileşimleriyle düzenlenir. GPI-ile-tutunan proteinler lipid sallarda özellikle yer alırlar ve diğer bazı zar proteini tipleri de, hücre sinyal iletimine ve endositoza aracılık etmek üzere, salda geçici olarak yer alırlar.

sağlamak üzere özelleşmiştir. Bu farklı işlevleri sürdürebilmek için plazma zarı proteinlerinin hareketleri hücre yüzeyindeki uygun bölgelerle sınırlanmalıdır. Bunu sağlayan mekanizmanın hiç değilse bir bölümü, epitel tabakasını oluşturan komşu hücreler arasında sıkı bağlantıların (bu bölümde daha ilerde tartışılacak) oluşumunu gerektirir. Bu bağlantılar sadece hücreler arasındaki alanı kapatmakla kalmaz aynı zamanda zar lipid ve proteinlerinin hareketini de engeller. Sonuç olarak, proteinler plazma zarındaki apikal ya da bazolateral bölgeler içerisinde hareket edebilirler ancak bir bölgeden diğerine geçemezler.

Lipid içeriği de zardaki proteinlerin serbest dağılımını bozar. Sfingolipidlerin (sfingomiyelin ve glikolipidler) ergime sıcaklıkları, gliserolden türeyen fosfolipidlerinkinden farklıdır. Sfingomiyelin ve glikolipidler, **lipid salları** denilen küçük, yarı katı yamalar şeklinde toplanma eğilimindedirler, kolesterolün sfingolipidlerle bir araya gelme eğilimi nedeniyle bu yapı kolesterolce de zengindir (Şekil 12.12). Sallar, GPI-ile-tutunan proteinler bakımından da zengindir, fosfolipid çift tabakanın esas kısmında bulunan GTP- bağlayan protein ve bir kaç protein kinaz gibi bazı proteinler de salın içine ve dışına hareket ederler. Bu proteinlerin sal içindeki geçici varlıkları, endositoz ve reseptör-aracılıklı sinyal iletimi gibi işlevler için gerekli kümelenmeyi sağlar.

Bazı sallar periferal zar proteinleri aracılığıyla hücre iskeletine bağlanarak sabitlenirler. Böyle bir periferal protein kaveolin'dir ve bir lipid sal alt grubu olan kaveola'ya bağlıdır. Bu bölümde daha sonra inceleneceği gibi, kaveolalar özellikle endositoz ile ilişkilidir.

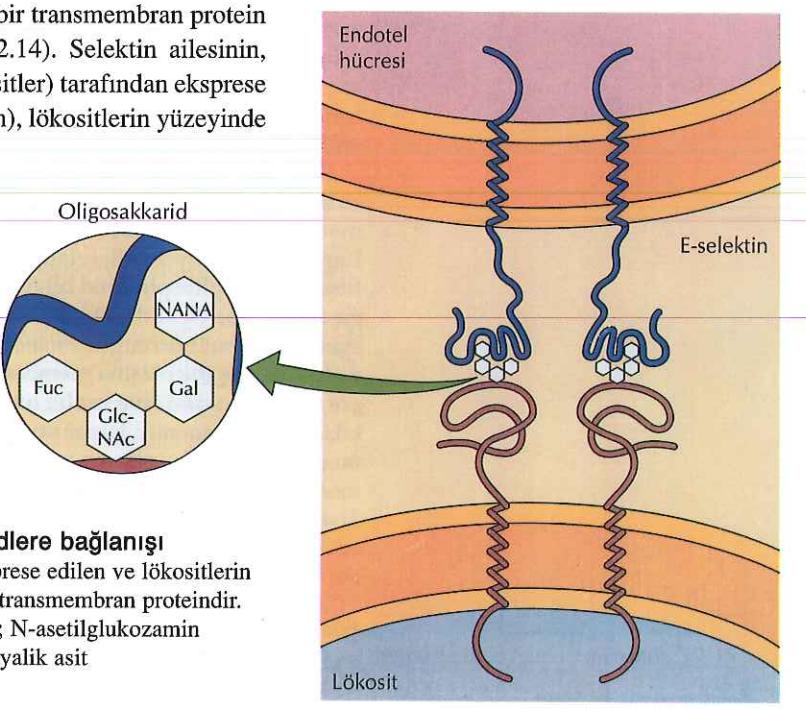


Şekil 12.13 Glikokaliks
Barsak epiteline ait, glikokaliksin (oklar) görüldüğü bir elektron mikroskop fotoğrafı. (Don Fawcett/Visuals Unlimited.)

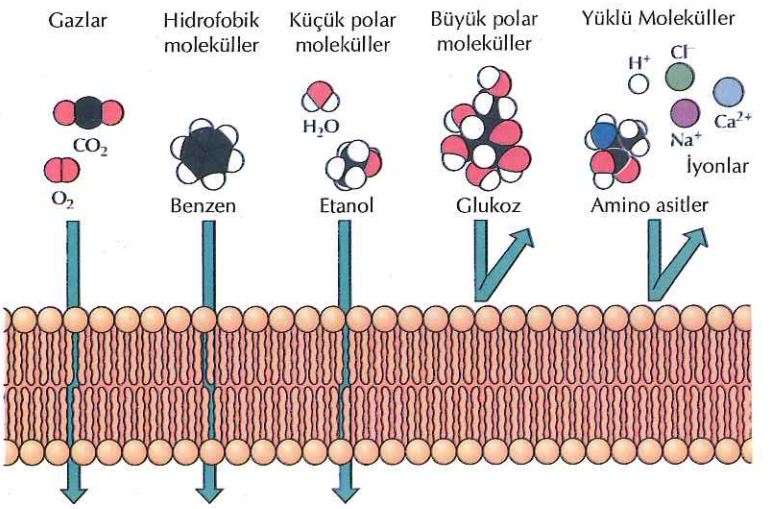
Glikokaliks

Daha önce ele alındığı gibi, plazma zar proteinlerinin hücre dışındaki kısımları genellikle glikozillenmiştir. Benzer şekilde, glikolipidlerin karbohidrat kısımları plazma zarının dış yüzünde sergilenir. Sonuçta hücrenin yüzeyi, transmembran proteinlerin ve glikolipidlerin oligosakkaridlerince oluşturulan ve **glikokaliks** olarak adlandırılan bir karbohidrat kılıfla kaplanır (Şekil 12.13).

Glikokaliksin görevinin bir bölümü hücre yüzeyini korumaktır. Ayrıca, glikokaliksin oligosakkaridleri, çeşitli hücre-hücre ilişkileri için bir belirteç olarak görev yapar. Bu ilişkilere iyi bilinen bir örnek beyaz kan hücrelerinin (lökositler) kan damarlarının içini kaplayan endotel hücrelerine yapışmasıdır ki, bu süreç lökositlerin, dolaşım sistemini terk ederek yaralı dokuda yangı oluşumunu başlatmalarını sağlar. Endotel hücreleri ile lökositler arasındaki yapışmanın (adezyon) ilk aşaması, hücre yüzeyindeki belli karbohidratları tanıyan ve **selektin** olarak adlandırılan bir transmembran protein ailesi aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 12.14). Selektin ailesinin, endotel hücreleri ve plateletler (trombositler) tarafından eksprese edilen iki üyesi (E-selektin ve P-selektin), lökositlerin yüzeyinde sergilenen özel oligosakkaridlere bağlanır. Farklı bir selektin (L-selektin) lökositler tarafından eksprese edilir ve endotel yüzeyindeki biroligosakkaridi tanır. Böylece, hücre yüzeyinde sergilenen oligosakkaridler, çok hücreli organizmaların farklı hücre tiplerinin tanımlanmasını sağlayan bir simge serisi oluşturur.



Şekil 12.14 Selektinlerin oligosakkaridlere bağlanışı
E-selektin, endotel hücreleri tarafından eksprese edilen ve lökositlerin yüzeyindeki oligosakkaridlere bağlanan bir transmembran proteindir. E- selektin tarafından tanınan oligosakkarid; N-asetilglukozamin (GlcNAc), fukoz (Fuc), galaktoz (Gal) ve siyalik asit (N-asetilnöraminik asit, NANA) içerir.



Şekil 12.15 Fosfolipid çift tabakanın geçirgenliği
Gazlar, hidrofobik moleküller ve küçük polar yüksüz moleküller fosfolipid çift tabaka içerisinden difüze olabilirler. Büyük polar moleküller ile yüklü moleküller difüze olamazlar.

Küçük Moleküllerin Taşınması

Hücrenin içeriği, plazma zarının küçük moleküllere seçici geçirgen olması sayesinde korunur. Biyolojik moleküllerin çoğu fosfolipid çift tabakadan geçemez, böylece plazma zarı, hücrenin dış ortamı ile sitoplazma arasında moleküllerin serbest değişimini önleyen bir engel oluşturur. Geçişi sağlayan özel proteinler (taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri), hücrenin sitoplazmasının bileşimini kontrol etmesine olanak sağlayacak şekilde, küçük moleküllerin zardan seçili geçişine aracılık ederler.

Pasif Difüzyon

Moleküllerin plazma zarından geçişlerinde en basit mekanizma **pasif difüzyon** dur. Pasif difüzyon sürecinde, basitçe, bir molekül fosfolipid çift tabaka içinde çözünür, bir yandan diğer yana difüze olur ve zarın diğer yanında sulu ortamda çözünür. Hiçbir zar proteini işe karışmaz ve geçiş yönü, basit şekilde, molekülün hücrenin içinde ve dışındaki göreli konsantrasyonu ile belirlenir. Moleküllerin net akışı daima konsantrasyon gradientinde aşağı doğrudur, yani, molekülün yüksek konsantrasyonda olduğu bölümden daha düşük konsantrasyonlu bölüme doğrudur.

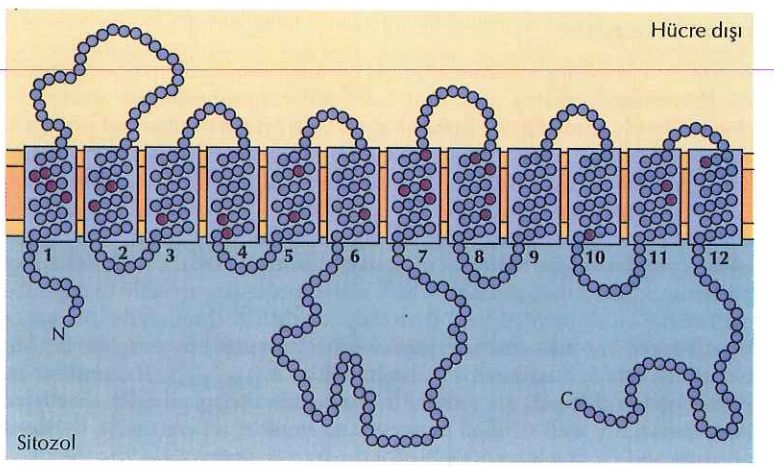
O halde pasif difüzyon, fosfolipid çift tabakada çözünebilen her molekülün plazma zarını geçebildiği ve hücrenin içi ile dışı arasında dengelendiği, seçici olmayan bir işlemdir. Önemli olan, yalnızca küçük ve göreli olarak hidrofobik moleküllerin fosfolipid çift tabakadan anlamlı oranda difüze olabilmesidir (Şekil 12.15). Sonuçta; gazlar (O_2 ve CO_2 gibi), hidrofobik moleküller (benzen gibi) ve küçük polar ancak yüksüz moleküller (H_2O ve etanol gibi) plazma zarından pasif difüzyonla geçebilirler. Buna karşın diğer biyolojik moleküller fosfolipid çift tabakanın hidrofobik iç bölümünde çözünemezler. Sonuç olarak, glukoz gibi daha büyük yüksüz polar moleküller ile herhangi büyüklükteki yüklü moleküller (H^+, Na^+, K^+ ve Cl^- gibi küçük iyonlar dahil) de plazma zarından pasif difüzyola geçemezler. Bu moleküllerin zardan geçişleri özel taşıma ve kanal proteinlerinin aktivitesini gerektirir ve böylece bir çok molekülün hücrenin içine ve dışına hareketi kontrol edilir.

Kolaylaştırılmış Difüzyon ve Taşıyıcı Proteinler

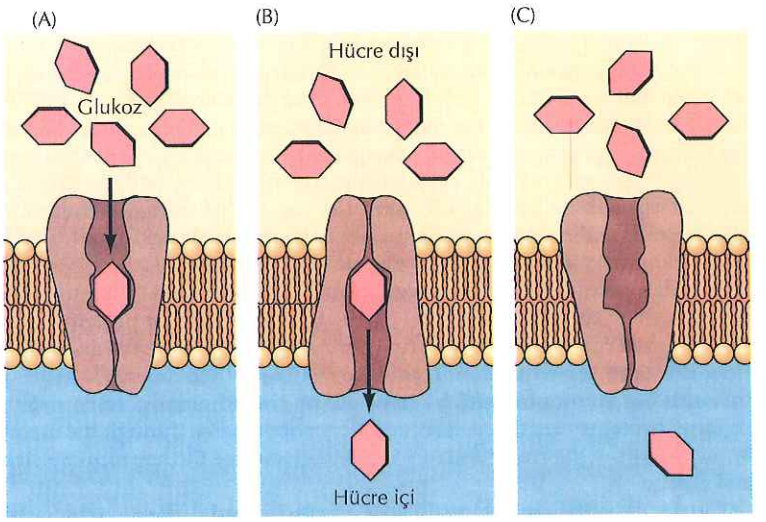
Kolaylaştırılmış difüzyon, pasif difüzyon gibi, moleküllerin, hücre içindeki ve dışındaki göreli konsantrasyonlarının belirlediği yönde hareketini kapsar. Dışarıdan enerji sağlanması gerekmez, moleküller, konsantrasyon gradientlerinin veya yüklü moleküller için zardaki elektrik potansiyelinin belirlediği yönde zardan geçerler. Ancak, kolaylaştırılmış difüzyon, taşınan moleküllerin fosfolipid çift tabakada çözünmeyişi ile pasif difüzyondan ayrılır. Bunun yerine, geçişleri, taşınan moleküllerin zarın hidrofobik iç kısmıyla direkt etkileşime girmeden geçmelerine olanak veren proteinler aracılığıyla olur. Bu sayede kolaylaştırılmış difüzyon, karbohidratlar, amino asitler, nükleotidler ve iyonlar gibi polar ve yüklü moleküllerin plazma zarını geçmelerini sağlar.

Genel olarak, kolaylaştırılmış difüzyona aracılık eden iki protein grubu belirlenmiştir: taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri. **Taşıyıcı proteinler,** taşınacak olan spesifik moleküle zarın bir tarafında bağlanırlar. Daha sonra, molekülün zardan geçmesine ve öte yanda serbest kalmasına olanak verecek şekilde bir yapısal değişikliğe uğrarlar. Bunun aksine **kanal proteinleri** (bir sonraki bölüme bakınız), zarın içinde, uygun büyüklük ve yükteki tüm moleküllerin serbestçe difüze olmasına olanak veren geçitler oluştururlar.

Taşıyıcı proteinler, bir çok hücrenin plazma zarlarından; şekerlerin, amino asitlerin ve nükleozidlerin kolaylaştırılmış difüzyonundan sorumludurlar. Metabolik enerjinin başlıca kaynağını oluşturan glukozun alınımı, plazma zarının en önemli taşıma işlevlerinden biridir ve glukoz taşıyıcısı, iyi tanımlanmış bir taşıyıcı protein örneğidir. Glukoz taşıyıcısı başlangıçta, insan kırmızı kan hücrelerinde toplam zar proteinlerinin %5'ini oluşturan, 55kd ağırlığında bir protein olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, izolasyonu ve bir cDNA klonunun dizi analizi glukoz taşıyıcısının, bir çok taşıyıcı protein için tipik bir yapısal özellik olan, 12 transmembran α-sarmal bölgesinin bulunduğunu ortaya çıkardı (Şekil 12.16). Bu transmembran α-sarmallar baskın olarak hidrofobik amino asitler içerir fakat, bir kaçı aynı zamanda polar amino asitlere de sahiptir ki bunların, proteinin iç kısmında glukoz bağlanma bölgelerini oluşturdukları düşünülmektedir.



Şekil 12.16 Glukoz taşıyıcının yapısı
Glukoz taşıyıcı 12 transmembran α-sarmala sahiptir. Fosfolipid çift tabakası içinde yer alan polar amino asitler koyu mor yuvarlaklarla belirtilmiştir. (G.I. Bell, C.F. Burant, J. Takeda ve G.W. Gould, 1993. J. Biol. Chem. 268: 19161'den alınmıştır.)



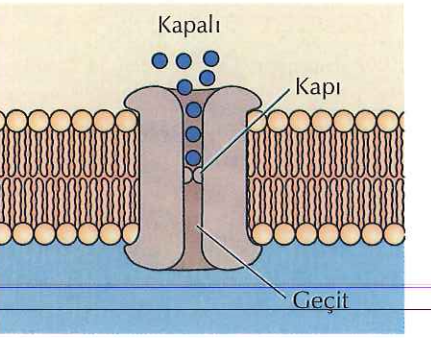
Şekil 12.17 Glukozun kolaylaştırılmış difüzyon modeli
Glukoz taşıyıcı, glukoz- bağlayan bölgesinin hücrenin dışında ya da içinde alternatif olarak sergilendiği iki yapısal form arasında dönüşür. (A)'da görülen ilk yapısal formda glukoz, hücre dışında sergilenen bölgeye bağlanır. Taşıyıcı daha sonra, glukoz- bağlayan bölgesi hücrenin içine bakacak ve glukoz sitoplazmaya serbest bırakılacak şekilde yapısını değiştirir (B). Daha sonra taşıyıcı başlangıçtaki yapıya geri döner (C).

Bir çok zar proteininde olduğu gibi, glukoz taşıyıcısının üç boyutlu yapısı bilinmemekte ve bu nedenle de glukoz taşınımının moleküler mekanizması sorusu yanıtlanamamaktadır. Ancak, kinetik çalışmalar, glukoz taşıyıcısının iki yapısal durum arasında dönüşerek işlev gördüğünü belirtmektedir (Şekil 12.17). İlk konformasyonda glukoz-bağlayan bir bölge hücrenin dışına bakmaktadır. Dıştaki bu bölgeye glukozun bağlanması taşıyıcıda, glukoz-bağlayan bölgenin artık, hücrenin içine yönelmesini sağlayan yapısal bir değişikliği uyarır. Böylece glukoz sitozole bırakılır ve taşıyıcı tekrar başlangıçtaki yapısına geri döner.

Eritrositler dahil bir çok hücre, hücre içindekinden daha yüksek bir hücre dışı glukoz konsantrasyonu ile karşı karşıyadır, bunun sonucunda, kolaylaştırılmış difüzyon glukozun içeri doğru net taşınımı ile sonlanır. Glukoz bu hücreler tarafından bir kez içeri alınınca süratle metabolize olur, böylece hücre içi glukoz düzeyi düşük kalır ve glukozun hücre dışı sıvılardan hücre içine taşınması sürer. Ancak, glukoz taşıyıcının yapısal değişimi geri dönüşümlü olduğundan, Şekil 12.17'deki aşamaların basitçe ters çalıştırılması ile glukoz aksi yöne doğru taşınabilir. Bu şekilde ters akış, örneğin, glukozun sentezlenerek dolaşıma verildiği karaciğer hücrelerinde görülür.

İyon Kanalları

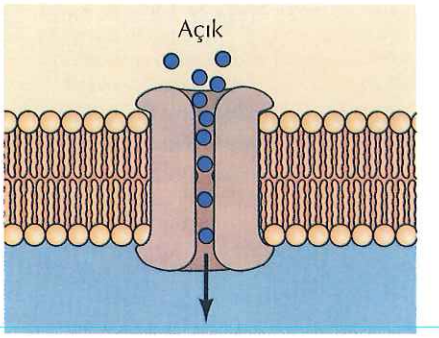
Taşıyıcı proteinlerin aksine kanal proteinleri, uygun büyüklük ve yükteki küçük moleküllerin fosfolipid çift tabakadan serbestçe geçebilmelerine olanak veren açık delikler oluştururlar. Kanal proteinlerinin bir grubu, daha önce bahsedilmiş olan ve bakteri dış zarından iyonlarla küçük polar moleküllerin serbestçe geçmelerine izin veren porinlerdir (bkz. Şekil 12.8). Bu bölümde daha sonra ele alınacak olan aralık bağlantılar (gap junctions) da, bitişik hücreler arasında moleküllerin geçişine olanak veren kanal proteinleri içerirler. Bir çok hücrenin plazma zarları su kanal proteinleri (aquaporin) de içerirler ki su molekülleri zarı, bu kanallar aracılığıyla, fosfolipid çift tabakadan difüzyonla geçişlerinden çok daha çabuk geçebilirler. En iyi tanımlanmış kanal proteinleri, iyonların plazma zarından geçişlerine



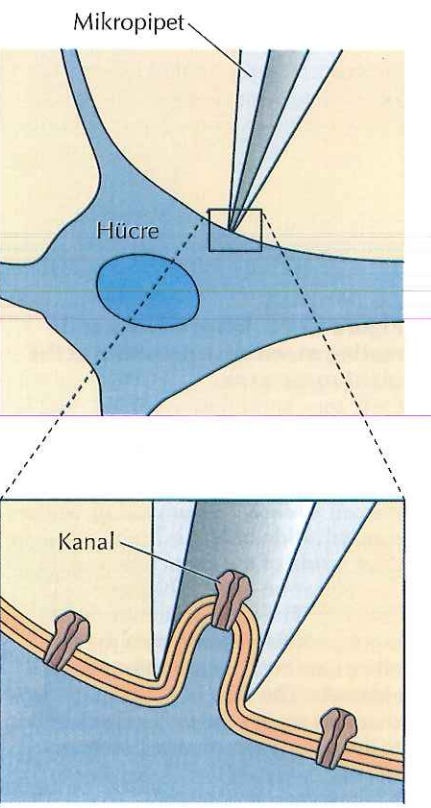
Şekil 12.18 Bir iyon kanalı modeli
Kapalı durumda iyonların akışı bir kapı tarafından engellenir. Kapının açılması iyonların kanal içinden hızla geçmesine izin verir. Kanal, sadece uygun büyüklük ve yükteki iyonların geçişini sınırlayan dar bir geçide sahiptir.

aracılık eden **iyon kanallarıdır.** İyon kanalları tüm hücrelerin zarlarında bulunmalarına rağmen en iyi çalışıldıkları yer, kontrollü açılıp kapanmalarının elektrik sinyallerinin iletiminden sorumlu olduğu sinir ve kastır.

İyon kanallarının üç özelliği işlevlerinin temelini oluşturur (Şekil 12.18). İlk olarak, kanallardan geçiş son derece hızlıdır. Açık kanallardan saniyede bir milyondan fazla iyon akışı olur- bu akış hızı, taşıyıcı proteinlerle taşınım hızının yaklaşık bin katıdır. İkinci olarak, Kanalların içindeki dar geçit sadece uygun büyüklük ve yükteki iyonların geçişi ile sınırlı olduğundan, kanallar yüksek düzeyde seçicidir. Bu nedenle, Na^+, K^+, Ca^{2+} ve Cl^-'un zardan geçmelerini özel kanal proteinleri sağlar. Üçüncü olarak, iyon kanallarının çoğu sürekli açık değildir. Onun yerine, iyon kanallarının açılması, özel sinyallere yanıt olarak kısa süreli açılan "kapılar" tarafından düzenlenir. Bazı kanallar **(ligand- kapılı kanallar)** sinirsel ileticilerin (nörotransmiter) ya da başka uyarıcı moleküllerin bağlanmasına yanıt olarak; diğerleri **(voltaj- kapılı kanallar)** ise, plazma zarında elektrik potansiyeli değişimlerine yanıt olarak açılırlar.



İyon kanallarının, elektriksel uyarıların iletimindeki önemli rolleri, Alan Hodgkin ve Andrew Huxley'in 1952'de yayınladıkları bir dizi güzel deneyle aydınlatılmıştır. Bu araştırmacılar, mürekkep balığının dev sinir hücrelerini model olarak kullandılar. Dev nöronların akson çapının 1mm olması, elektrot yerleştirilerek sinir uyarılarının iletilmesi sırasında zar potansiyeli değişimlerinin ölçülebilmesine olanak verir. Hodgkin ve Huxley bu yaklaşımla, zardaki bu potansiyel değişikliklerinin, plazma zarındaki Na^+ ve K^+ kanallarının denetimli biçimde açılıp kapanmalarının sonucu olduğunu gösterdiler. Daha sonra, 1976'da Erwin Neher ve Bert Sakmann tarafından geliştirilen yama-kıskacı **(patch clamp)** yöntemi kullanılarak, iyon kanallarının bireysel aktivitesini incelemek mümkün oldu (Şekil 12.19). Bu yöntemde, uç çapı 1µm olan bir mikropipet kullanılarak zarın küçük bir bölümü izole edilir ve iyonların incelenecek olan tek kanaldan akışına izin verilerek, iyon kanallarının aktivitelerinin incelenmesinde doğruluk derecesi büyük oranda artırılır.



İyonların zardaki kanallardan akışı, plazma zarının iki yanında iyon gradientinin oluşmasına bağlıdır. Sinir ve kas dahil tüm hücreler, iyonları plazma zarından aktif olarak taşımak için ATP'nin hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan iyon pompalarına (bir sonraki kısımda tartışılıyor) sahiptirler. Sonuç olarak, sitoplazmanın iyon konsantrasyonu hücre dışı sıvılarınkinden oldukça farklıdır

Şekil 12.19 Yama-kıskacı (patch clamp) yöntemi
Zarın küçük bir parçası bir mikropipetin ucunda izole edilir. Daha sonra, yakalanan kanalın davranışının ölçülmesine olanak sağlamak üzere, pipetin içerisinden uyarım uygulanır. (E. Neher ve B. Sakmann, 1992. Sci. Am. 266(3): 44'den alındı.)

TABLO 12.1 Hücre dışı ve hücre içi iyon konsantrasyonları

İyon	Konsantrasyon (mM) Hücre içi	Hücre dışı
Mürekkep balığı aksonu		
K^+	400	20
Na^+	50	450
Cl^-	40-150	560
Ca^{2+}	0.0001	10
Memeli hücresi		
K^+	140	5
Na^+	5-15	145
Cl^-	4	110
Ca^{2+}	0.0001	2.5-5

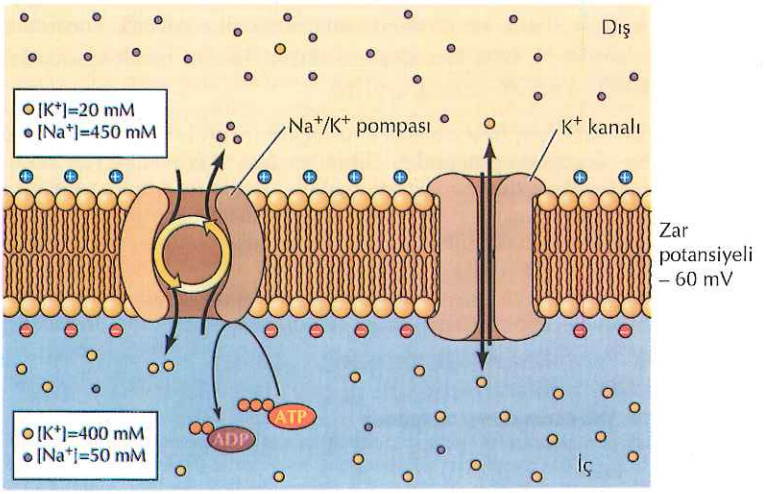
(Tablo 12.1). Örneğin, K^+ hücre içine pompalanırken Na^+ aktif olarak hücre dışına pompalanır. Mürekkep balığı aksonunda, bu nedenle, sitozoldeki K^+ konsantrasyonu çevre sıvıdan 20 kat kadar yüksekken, N^+ konsantrasyonu hücre dışı sıvıda hücre içindekinden yaklaşık 10 kat yüksektir.

İyonların elektrik yüklü olmaları nedeniyle, taşınmaları plazma zarının iki yanında bir elektrik gradientinin gelişimi ile sonuçlanır. Dinlenme halindeki bir mürekkep balığı aksonunda, hücre içi dışına göre negatif olmak üzere, plazma zarının iki yanında yaklaşık 60mV değerinde bir elektrik potansiyeli vardır (Şekil 12.20). Bu elektrik potansiyeli hem iyon pompalarından hem de dinlenme halindeki hücrenin plazma zarında açık bulunan kanallardan iyon geçişinden kaynaklanır. Mürekkep balığının dinlenme halindeki bir aksonunun plazma zarı açık K^+ kanallarına sahiptir ve bu nedenle Na^+ ya da diğer iyonlardan daha fazla K^+ geçirir. Sonuçta, dinlenme halindeki zar potansiyeline en büyük katkıyı K^+ geçişi sağlar.

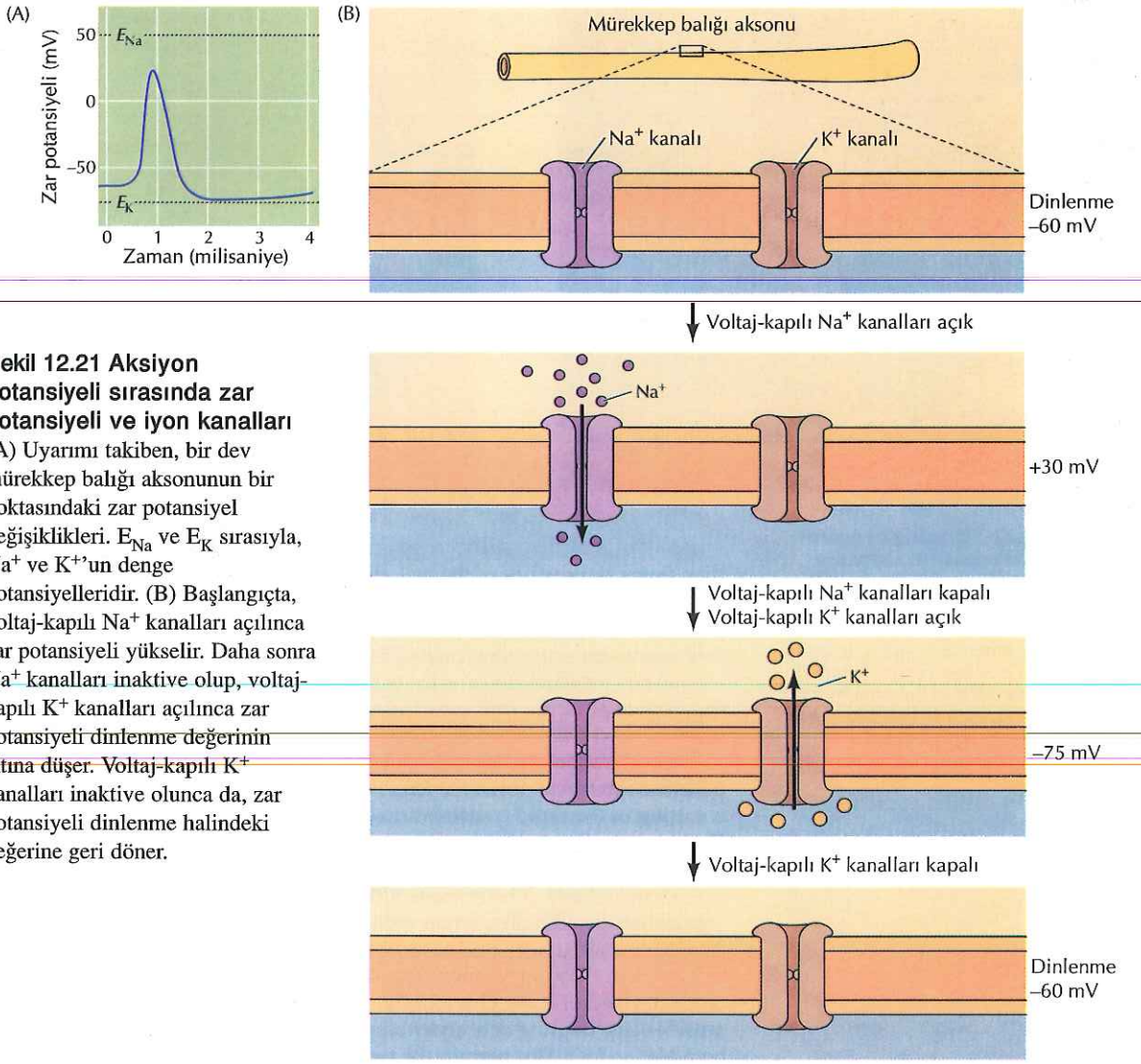
Bölüm 10'da tartışıldığı gibi, iyonların zardan geçişleri elektrokimyasal gradientin hem konsantrasyon hem de voltaj bileşenleri ile desteklenir. Örneğin, mürekkep balığı aksonunun içinde hücre dışı sıvıya kıyasla 20 kat fazla K^+ konsantrasyonu K^+'u hücre dışına çıkmaya sevk eder. Ancak, K^+ pozitif yüklü olduğundan, K^+'un hücreden çıkması, hücrenin içi negatif yüklü olacak şekilde, zarda bir elektrik potansiyeli oluşturur. Bu zar potansiyeli K^+ un hücre dışına süregelen akışına karşı çıkar ve sistem, K^+ konsantrasyon gradientinin zar potansiyeli ile dengelendiği bir denge durumuna ulaşır. Kantitatif olarak, iyon konsantrasyonu ile zar potansiyeli arasındaki ilişki **Nernst eşitliği** ile verilir:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

Burada; V volt cinsinden denge potansiyeli, R gaz sabitesi, T mutlak sıcaklık, z iyonun yükü, F Faraday sabitesi ve Co ve Ci, sırasıyla, hücrenin dışındaki ve içindeki iyon konsantrasyonunu belirtir. Her iyon için ayrı bir denge potansiyeli vardır ve zar potansiyeli plazma zarından geçen tüm iyonların akışıyla belirlenir. Bununla beraber, mürekkep balığının dinlenme halindeki aksonları



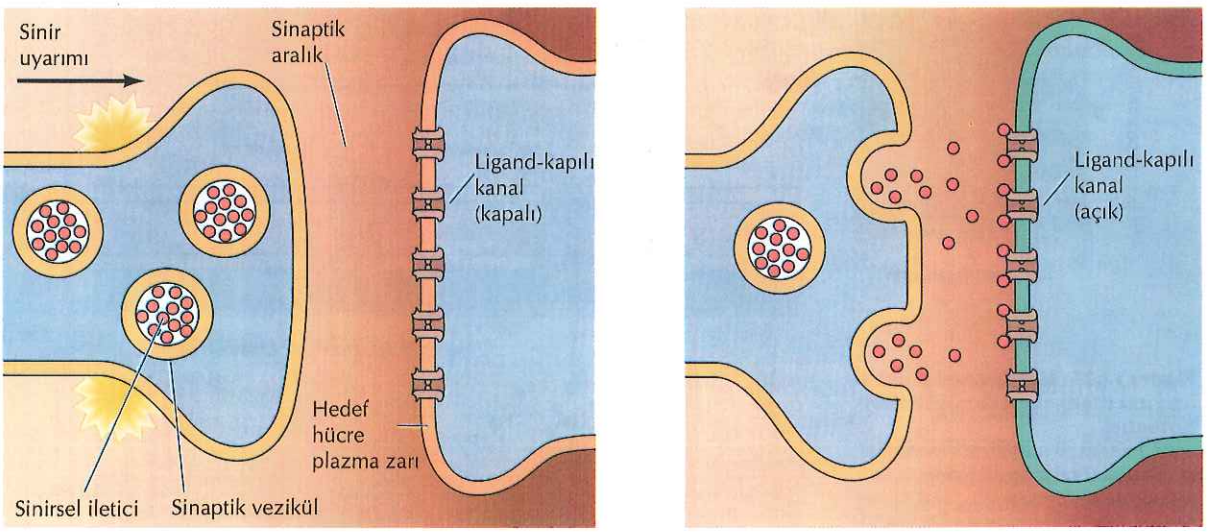
Şekil 12.20 Dev mürekkep balığı aksonunda iyon gradienti ve dinlenme zar potansiyeli
Sinirsel uyarının iletiminde işlev gören iyonlar olduklarından sadece Na^+ ve K^+'un konsantrasyonları gösterilmiştir. K^+ hücre içine pompalanırken Na^+ hücre dışına pompalanır, böylece, aksonda Na^+ konsantrasyonu hücre dışında içindekine göre daha fazlayken, K^+ konsantrasyonu içerde dışarıdakinden fazladır. Dinlenme halindeki zar, açık K^+ kanalları içerdiği için, K^+'a diğer iyonlardan ve Na^+'dan daha geçirgendir. Bu nedenle, -60mV'luk dinlenme halindeki zar potansiyeline en büyük katkıyı K^+ akışı yapar ve bu nedenle K^+'un denge potansiyeline yakındır.



Şekil 12.21 Aksiyon potansiyeli sırasında zar potansiyeli ve iyon kanalları
(A) Uyarımı takiben, bir dev mürekkep balığı aksonunun bir noktasındaki zar potansiyel değişiklikleri. E_{Na} ve E_K sırasıyla, Na^+ ve K^+'un denge potansiyelleridir. (B) Başlangıçta, voltaj-kapılı Na^+ kanalları açılınca zar potansiyeli yükselir. Daha sonra Na^+ kanalları inaktive olup, voltaj-kapılı K^+ kanalları açılınca zar potansiyeli dinlenme değerinin altına düşer. Voltaj-kapılı K^+ kanalları inaktive olunca da, zar potansiyeli dinlenme halindeki değerine geri döner.

K^+'a, Na^+ ve diğer iyonlara (Cl^- dahil) olduğundan daha fazla geçirgen olduğu için dinlenme halindeki zar potansiyeli (-60mV), hücre içi ve hücre dışı K^+ konsantrasyonunun belirlediği denge potansiyeline (-75mV) yakındır.

Sinir uyarıları (**aksiyon potansiyelleri**) akson boyunca ilerledikçe, zar depolarize olur (Şekil 12.21). Zar potansiyeli milisaniyeden daha kısa sürede -60mV'dan, yaklaşık +30mV'a değişir, bundan sonra yeniden negatif olur ve dinlenme değerine geri döner. Bu değişimlerin nedeni, voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanallarının hızla, sıralı açılıp kapanmalarıdır. Başlangıçtaki göreli küçük değişiklikler (-60 dan yaklaşık olarak -40mV'a) Na^+ kanallarının hızlı, ancak kısa süreli açılmasına yol açar. Bu, Na^+'un, gerek konsantrasyon gradienti gerekse zar potansiyeli tarafından desteklenerek hücre içine akmasına olanak verir. Na^+'un ani girişi zar potansiyelinde büyük değişikliğe neden olur ve Na^+'un yaklaşık +50mV'luk denge potansiyeline yaklaşarak, +30mV'a yakın bir değere yükselir. Bu anda Na^+ kanalları

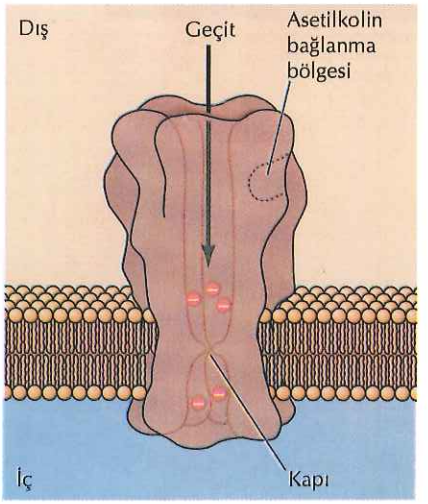


Şekil 12.22 Bir sinapsta nörotransmiter (sinirsel iletici) salınımıyla sinyal iletimi
Bir sinir uyarımının nöronun ucuna ulaşması, sinaptik veziküllerin plazma zarıyla kaynaşmasını ve nörotransmiterin presinaptik hücreden sinaptik aralığa serbestleşmesini uyarır. Sinirsel iletici, hedef hücrenin plazma zarındaki reseptörlere ve açık ligand-kapılı iyon kanallarına bağlanır.

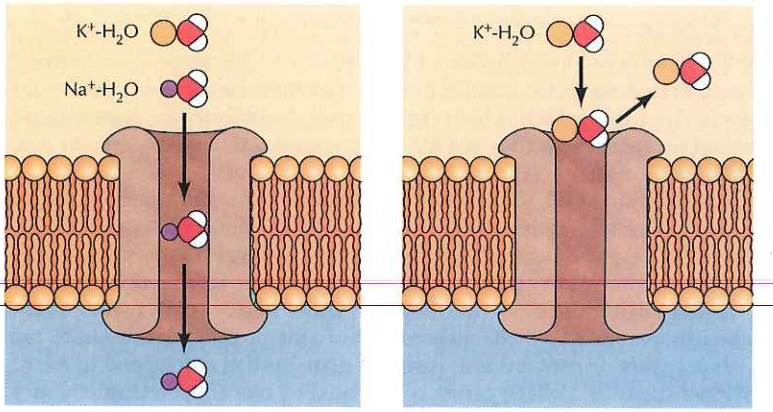
inaktifleşir ve voltaj-kapılı K^+ kanalları açılarak, zarın K^+ geçirgenliği önemli düzeyde artar. Daha sonra K^+, hem zar potansiyeli hem de K^+ konsantrasyon gradientinin etkisiyle süratle hücre dışına akar ve böylece, zar potansiyelinde -75mV'a kadar (K^+'un denge potansiyeli), hızlı bir düşüşe neden olur. Zar potansiyelindeki bu değişim voltaj-kapılı K^+ kanallarını inaktive eder ve zar potansiyeli, uyarılmamış hücrelerde açık kalan kanallardan K^+ ve diğer iyonların akışıyla belirlenen, dinlenme halindeki -60mV düzeyine geri döner.

Plazma zarında bitişik bölgelerin depolarizasyonu, aksiyon potansiyellerinin sinir hücresi aksonları boyunca aşağı doğru hareket etmesini sağlar ve sonuçta, sinir uyarıları uzun mesafeler boyunca hızla iletilir. Örneğin, insan motor nöronlarının aksonları bir metreden daha uzun olabilir. Nöronların çoğunda aksiyon potansiyellerinin nöron ucuna ulaşması, sinaps bölgesinde hücreler arasında sinyal taşıyan, asetil kolin gibi sinirsel ileticilerin (nörotransmiter) salınmasını uyarır (Şekil 12.22). Presinaptik hücrelerden salgılanan nörotransmiterler postsinaptik hücrelerin zarlarındaki reseptörlere bağlanarak, ligand-kapılı iyon kanallarının açılmasını sağlarlar. En iyi tanımlanmış kanallardan biri, kas hücrelerinin nikotinik asetilkolin reseptörleridir. Asetilkolinin bağlanması, Na^+ ve K^+'un her ikisini de geçiren bir kanalı açar. Bu, Na^+'un süratle içeri akmasına olanak verir, kas hücresinin zarı depolarize olur ve bir aksiyon potansiyeli tetiklenir. Aksiyon potansiyeli, voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarını açılmasına ve kasılmayı uyaran hücre içi Ca^{2+} artışına neden olur (bkz. Şekil 11.26).

İlk kez 1970'lerde, çarpan balığın (Torpedo ray) elektrik organından izole edilen bu asetilkolin reseptörü, ligand-kapılı iyon kanalı prototipidir. Reseptör zar içerisinde bir silindir şeklinde düzenlenmiş beş alt birimden oluşur (Şekil 12.23). Kapalı durumunda



Şekil 12.23 Nikotinik asetilkolin reseptör modeli
Reseptör, merkezdeki bir geçit çevresinde dizilmiş beş alt birim içerir. Reseptörün hücre dışına bakan kısmındaki bir bölgeye asetilkolinin bağlanması, kanal geçişini açan allosterik değişiklikleri uyarır. Kanal, negatif yüklü iyonların geçişini engelleyen negatif yüklü amino asitlerle kaplıdır. (N. Unwin, 1993. Cell 72/ Neuron 10 (Suppl.): 31)



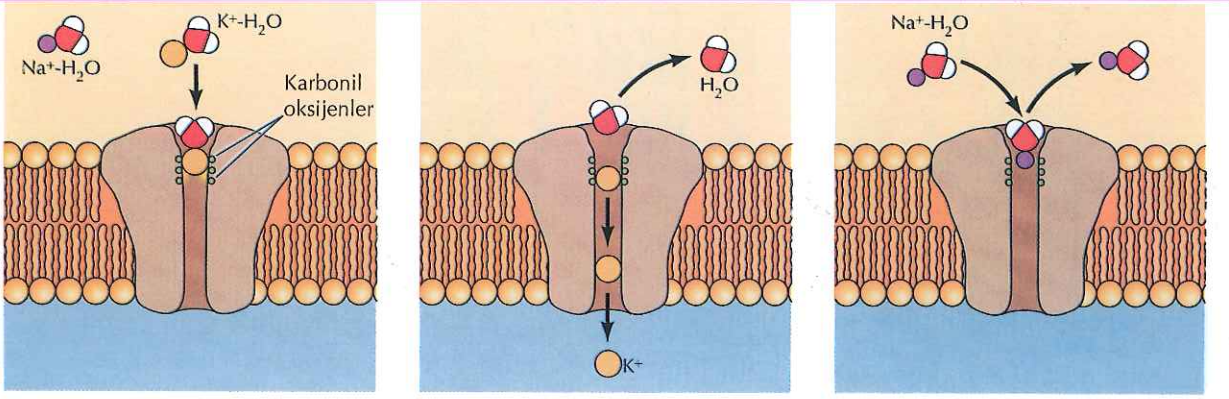
Şekil 12.24 Na^+ kanallarının iyon seçiciliği
Dar geçit tek su molekülüne bağlı N^+'un geçişine izin verir ancak, K^+'un ya da daha büyük iyonların geçişini engeller.

geçiş kanalının, hidrofobik amino asitlerin yan gruplarınca bloke edildiği sanılmaktadır. Asetilkolinin bağlanması reseptörde yapısal değişiklik uyarır, bu hidrofobik yan zincirler kanaldan çekilir ve Na^+ ve K^+ dahil pozitif yüklü iyonların geçmesine olanak veren bir geçit açılır. Ancak, kanal negatif yüklü amino asitlerle kaplı olduğu için, Cl^- gibi negatif yüklü iyonları geçirmez.

Voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanalları çok daha gelişmiş düzeyde bir seçicilik sergilerler. Na^+ kanalları, Na^+ için K^+'a göre on kattan daha fazla geçirgen iken, K^+ kanalları K^+ için Na^+'a göre bin kattan daha fazla geçirgendir. Na^+ kanallarının seçiciliği, büyüklük filtresi görevi yapan dar geçit dayanağıyla kısmen açıklanabilir. Na^+'un iyon çapı (0.95Å) K^+'un kinden (1.33Å) küçüktür ve Na^+ kanalı geçişinin K^+'un veya daha büyük iyonların geçişini engelleyecek kadar dar olduğu düşünülmektedir (Şekil 12.24).

K^+ kanalları da daha büyük iyonların geçişini önleyecek kadar dar geçitlere sahiptir. Ancak, Na^+ daha küçük iyon çapına sahip olduğu için, bu durum bu kanalların K^+ için seçici geçirgenliğini açıklamaz. K^+ kanalının seçiciliği, 1998'de K^+ kanalının üç boyutlu yapısının X-ışını kristallografisi yöntemiyle tanımlanması sonucu aydınlanan farklı bir mekanizmaya dayanmaktadır (Şekil 12.25). Kanal geçidi, polipeptid omurgaya bağlı karbonil oksijen (C=O) atomlarıyla kaplı, dar bir seçici filtre içerir. Seçici filtreye bir K^+ iyonu girdiğinde bu karbonil oksijeni ile etkileşimi K^+'un bağlı olduğu su molekülünü

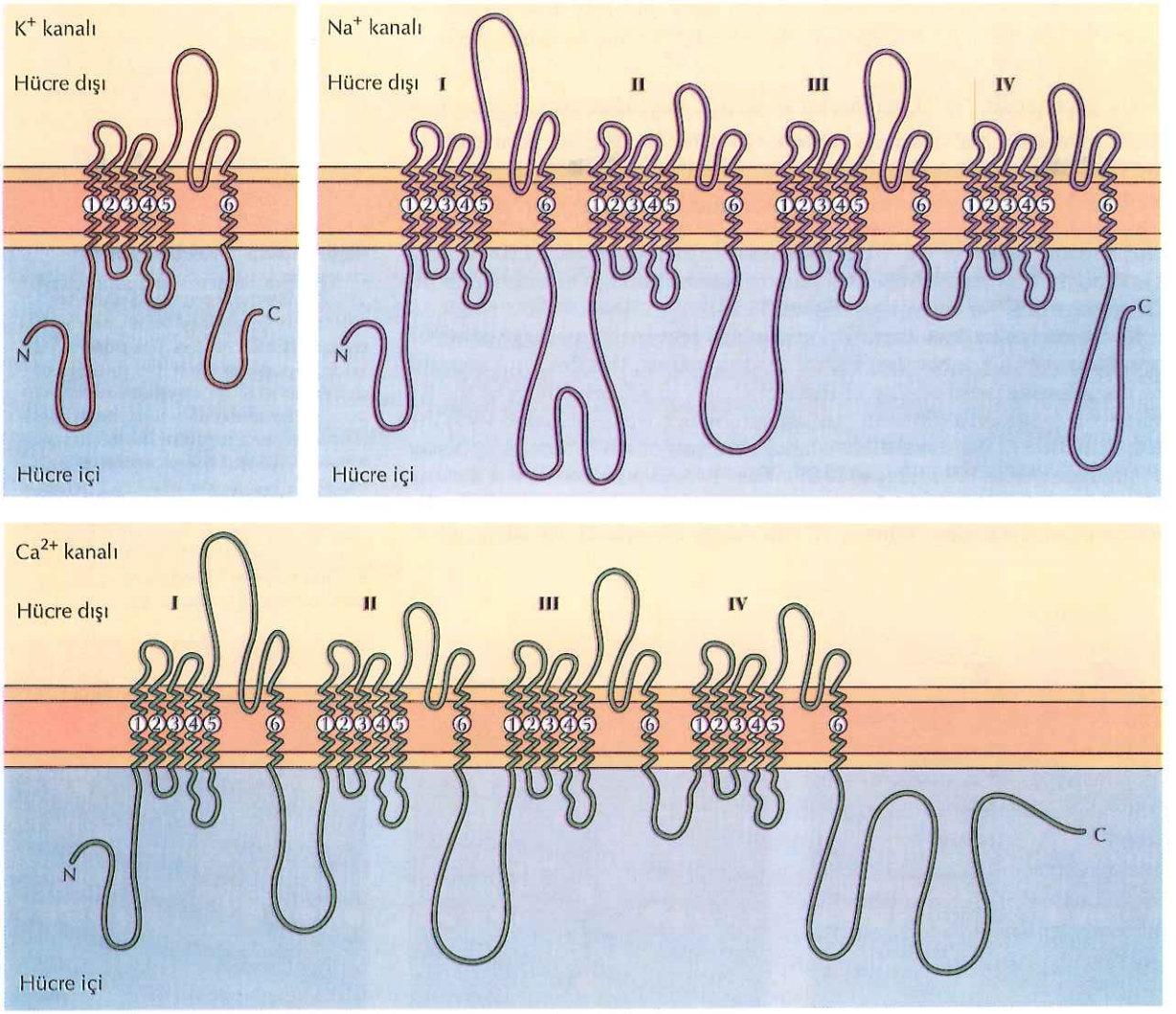
Şekil 12.25 K^+ kanallarının seçiciliği
K^+ kanalı karbonil oksijeni ile kaplı, dar bir seçici filtre içerir. Geçit ancak, K^+ ile karbonil oksijeni arasındaki etkileşimler sonucu bağlı tüm su molekülleri uzaklaştırılmış olan susuz K^+'un geçmesine olanak verecek kadar geniştir. Na^+, seçici filtredeki karbonil oksijenleri ile etkileşemeyecek kadar küçüktür, bu nedenle, kanal geçidinden geçemeyecek kadar büyük bir komlekste, su moleküllerine bağlı olarak kalır.

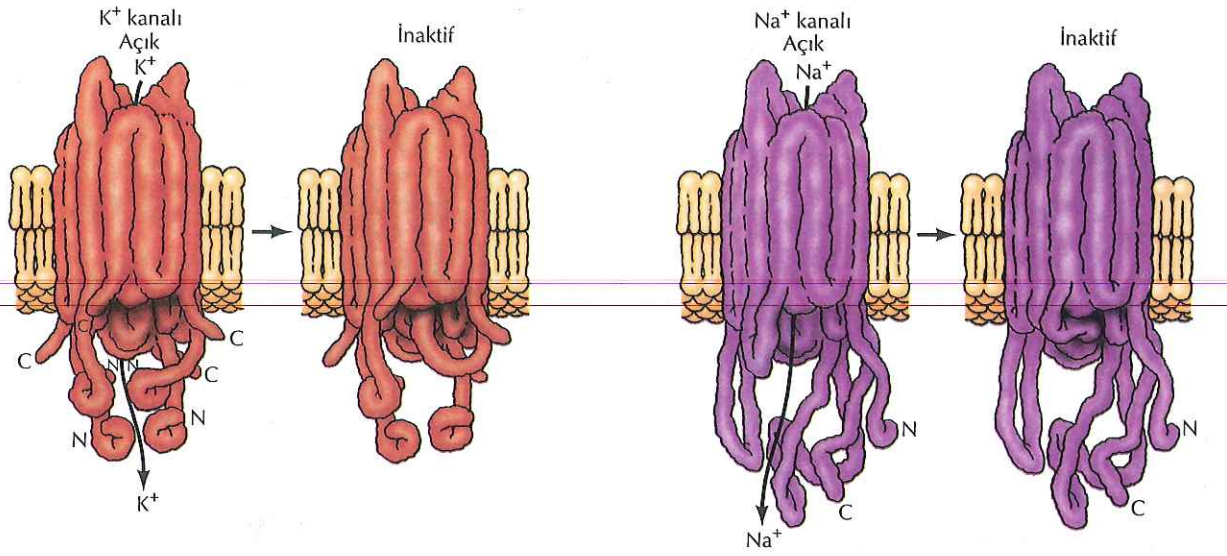


uzaklaştırır ve susuz K^+'un pordan geçmesini sağlar. Bunun aksine, susuz bir Na^+, katı şekilde açık duran seçici filtredeki karbonil oksijeni ile etkileşmek için çok küçüktür. Sonuç olarak Na^+, kanaldan geçemeyecek kadar büyük bir sulu kompleksdeki su moleküllerine bağlı kalır.

Voltaj-kapılı Na^+, K^+ ve Ca^{2+} kanallarının hepsi, büyük bir ilişkili proteinler ailesinin üyeleridir (Şekil 12.26). Örneğin, *C.elegans*'ın genom dizilimi, olasılıkla hücre sinayal iletiminde farklı roller oynaması gereken iyon kanallarını kodlayan 200 civarında geni ortaya çıkardı. K^+ kanalları, her biri iki ya da altı transmembran α sarmala sahip dört alt birimden oluşur. Na^+ ve Ca^{2+} kanalları tek bir polipeptid zincirinden oluşmuşlardır, ancak her polipeptid zinciri, K^+ kanal alt birimlerine benzeyen dört tekrar bölgesi içerir. Transmembran α sarmallardan, çok sayıda pozitif yüklü amino asit içeren bir tanesi voltaj-kapı işlevini görür. Zarın depolarizasyonu pozitif yüklerin hücrenin dışına doğru dönmesine neden olur, transmembran bölgenin konumu değişir ve kanal açılır. Aksiyon potansiyelinin yayılması

Şekil 12.26 Voltaj-kapılı katyon kanallarının yapıları
K^+, Na^+ ve Ca^{2+} kanalları bir benzer proteinler ailesine dahildir. K^+ kanalı, bir tanesi aşağıda görülen, dört identik alt birimin birleşmesiyle oluşur. Na^+ kanalı, her biri bir K^+ kanal alt birimine benzeyen dört tekrar bölüme sahip tek bir polipeptid zinciridir. Ca^{2+} kanalı Na^+ kanalına benzer. Her alt birim ya da bölüm, zarı - kat eden altı α sarmal içerir. α sarmallardan 4 ile gösterileni çok sayıda, pozitif yüklü amino asit içerir ve zar potansiyelindeki değişikliklere yanıt olarak kanalın açılmasını sağlayan voltaj algılayıcısı olarak görev yapar.





Şekil 12.27 K^+ ve Na^+ kanallarının inaktivasyonu

Voltaj-kapı açılmasını takiben K^+ ve Na^+ kanalları, polipeptid zincirinin sitoplazmik bir bölümünün geçide bağlanmasıyla, hızla inaktive olur. K^+ kanalında inaktivasyon yumak-ve-zincir mekanizması ile sağlanır ki, burada yumak, polipeptid zincirinin amino ucunu belirtmektedir. Na^+ kanalında inaktivasyon, halkaları birbirine bağlayan III ve IV bölümleri tarafından sağlanır.

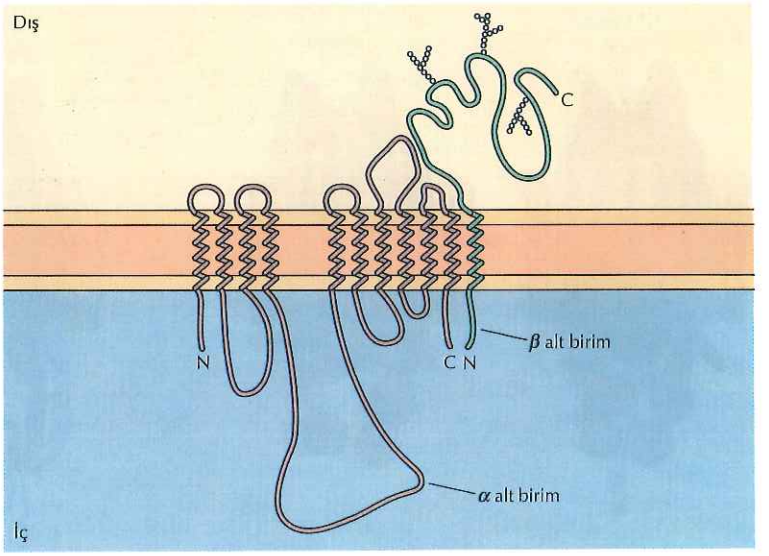
sırasında Na^+ ve K^+ kanallarının hızlı inaktivasyonu, polipeptidin, kanal geçidinin sitoplazmik açıklığına bağlanarak daha fazla iyon geçişini engelleyen sitoplazmik parçası tarafından gerçekleştirilir (Şekil 12.27).

İyon kanallarının pek çok tipi (Ca^{2+} ve Cl^- kanalları dahil) farklı nörotransmiterlere yanıt verir veya zar depolarizasyonunu takiben farklı kinetiklerle açılıp kapanırlar. Birçok kanalın birlikte ve düzenli davranışları sinir sisteminde sinyal iletiminin karmaşıklığının nedenidir. Ayrıca, bir sonraki bölümde anlatıldığı gibi, iyon kanallarının rolü elektrikle uyarılabilen sinir ve kas hücreleriyle sınırlı değildir, diğer hücre tiplerinde de sinyal iletiminde oldukça önemli rol oynarlar. Böylece, iyon kanallarının düzenli açılıp kapanmaları, hücrelere çeşitli çevresel uyarılara yanıt verebilmesi için duyarlı ve çok yönlü mekanizmalar kazandırırlar.

ATP Hidroliziyle Desteklenen Aktif Taşıma

Moleküllerin kolaylaştırılmış difüzyonla, taşıyıcı proteinler veya kanal proteinleri üzerinden net akışı daima, zarın iki yanındaki elektrokimyasal gradientin belirlediği, enerjetik olarak avantajlı yöndedir. Ancak, bir çok durumda hücrenin, molekülleri konsantrasyon gradientlerine karşı taşıması gerekir. **Aktif taşımada,** eşlenen diğer bir reaksiyondan (ATP hidrolizi gibi) elde edilen enerji, moleküllerin enerjetik olarak tercih edilmeyen yönde yukarı doğru taşınması amacıyla kullanılır.

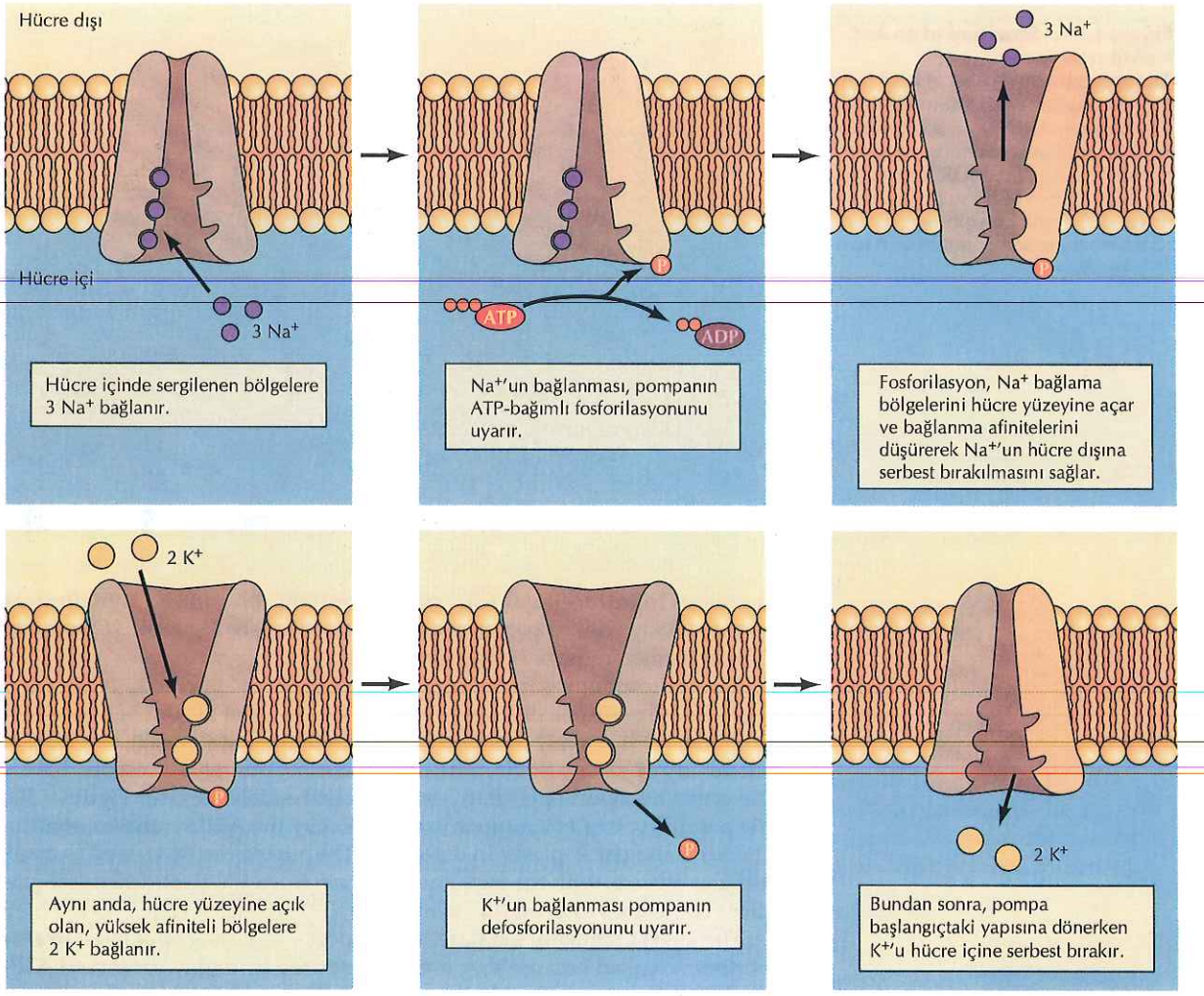
Plazma zarının iki yanında iyon gradiyentlerinin sürekliliğinden sorumlu olan **iyon pompaları,** direkt olarak ATP hidroliziyle çalışan aktif taşımanın önemli örneklerini oluştururlar. Daha önce tartışıldığı gibi (bkz. Tablo 12.1), Na^+ konsantrasyonu hücrenin dışında içindekinden yaklaşık on kat fazlayken, K^+ konsantrasyonu içerde dışardakinden fazladır. Bu iyon gradienti, Na^+ ve K^+'u elektrokimyasal



Şekil 12.28 Na^+-K^+ pompası'nın yapısı
Na^+-K^+ pompası, 10 transmembran bölüm içeren α alt birimi ile tek bir transmembran β alt biriminden oluşan bir heterodimerdir. β alt birimi yüksek oranda glikozillenmiştir.

gradiyentlerine karşı taşımak için ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanan **Na^+-K^+ pompası** (aynı zamanda **Na^+-K^+ ATPaz** olarak da adlandırılır) tarafından korunur (Şekil 12.28). Bu olay, ATP tarafından pompada oluşturulan yapısal değişikliklerin sonucudur (Şekil 12.29). Önce, hücre içindeki yüksek-afiniteli bölgelere Na^+ iyonu bağlanır. Bu bağlanma, ATP'nin hidrolizine ve pompanın fosfatlanmasına yol açar ve böylece, Na^+-bağlayan bölgeleri hücre dışında sergileyecek yapısal değişiklikler uyarılır ve Na^+'a afinitesi azalır. Sonuç olarak, bağlı Na^+ hücre dışı sıvılara serbest bırakılır. Aynı anda, yüksek-afiniteli K^+ bağlayan bölgeler hücre dış yüzeyinde sergilenir. Bu bölgelere hücre dışındaki K^+'un bağlanması pompaya bağlı fosfatın ayrılmasını uyarır ve böylece, K^+-bağlayan bölgelerin sitoplazmaya dönmelerini ve bağlama afinitelerinin azalmasını sağlayan ikinci bir yapısal değişiklik gerçekleşir. Pompada, Na^+ için üç ve K^+ için iki bağlanma bölgesi bulunduğundan, her döngüde bir ATP molekülü harcanarak, plazma zarından üç Na^+ ve iki K^+ taşınır.

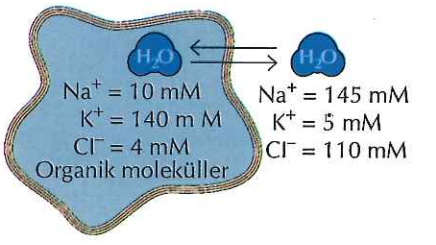
Hayvan hücrelerinin bir çoğunda, kullanılan ATP'nin yaklaşık %25'ini tüketiyor olması, Na^+-K^+ pompasının öneminin bir göstergesidir. Pompanın sağladığı Na^+ ve K^+ gradiyentlerinin önemli rollerinden biri, sinir ve kasta elektrik sinyallerinin yayılımıdır. Az sonra tartışılacağı gibi, pompanın geliştirdiği Na^+ gradiyentinden, diğer çeşitli moleküllerin aktif taşınımı için de yararlanılır. Hayvan hücrelerinin çoğunda, Na^+-K^+ pompasının diğer bir önemli görevi de, ozmotik dengenin ve hücre hacminin korunmasıdır. Sitoplazma, makromoleküller, amino asitler, şekerler ve nükleotidler dahil olmak üzere yüksek konsantrasyonda organik molekül içerir. Karşıt dengeleyen olmaması halinde bu durum, ozmozla içeri doğru su akışına neden olur ve kontrol edilmediği taktirde hücrenin şişmesi ve sonunda patlamasıyla sonuçlanır. Gerekli karşıt denge, Na^+-K^+ pompasının oluşturduğu iyon gradiyentleri ile sağlanır (Şekil 12.30). Özellikle, pompa hücre dışında içindekinden daha yüksek Na^+



Şekil 12.29 Na^+-K^+ pompası çalışma modeli

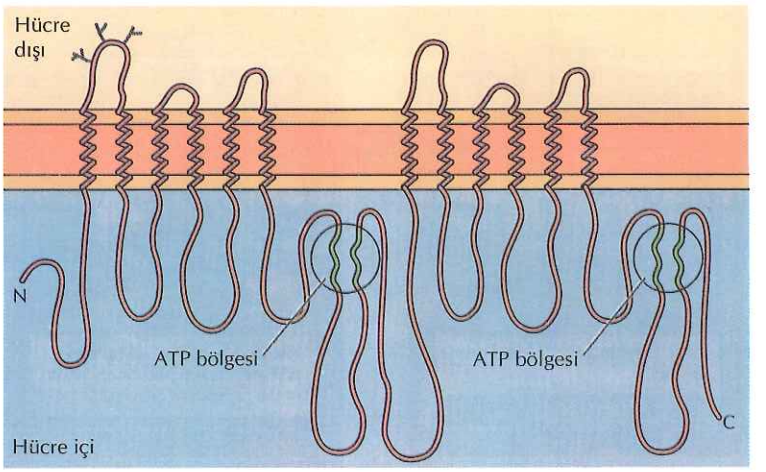
konsantrasyonu oluşturur. Daha önce anlatıldığı gibi, daha sonra K^+'un açık kanallardan geçişi plazma zarının iki yanında elektrik potansiyeli oluşturur. Bu zar potansiyeli de, Cl^-'un hücre dışına çıkmasına neden olur, sonuçta hücre dışındaki Cl^- iyon konsantrasyonu (Na^+'unki gibi) hücre dışı sıvılarda sitoplazmadakinden on kat daha yüksektir. İyon konsantrasyonlarındaki bu farklılık, ozmotik basıncı eşitleyerek ve suyun içeri doğru hareketini önleyerek, hücre içindeki organik moleküllerin yüksek konsantrasyonunu dengeler.

Ca^{2+}'un plazma zarından aktif taşınımı, yapısal olarak Na^+-K^+ pompasını andıran ve benzer şekilde ATP hidroliziyle çalışan bir Ca^{2+} pompasıyla sağlanır. Ca^{2+} pompası Ca^{2+}'u hücre dışına taşır, bu nedenle hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu oldukça düşüktür: 1mM civarındaki hücre dışı konsantrasyonuna karşın, yaklaşık 0.1µM.



Şekil 12.30 Tipik bir memeli hücresinde plazma zarının iki yanındaki iyon gradiyentleri

Na^+ ve Cl^- konsantrasyonları hücre dışında içindekinden fazla iken, K^+ içerde dışardakinden yüksektir. Na^+ ve Cl^-'un hücre içindeki düşük konsantrasyonu organik moleküllerin yüksek konsantrasyonunu dengeler, ozmotik basıncı eşitleyerek suyun içeri doğru net girişini engeller.



Şekil 12.31 Bir ABC taşıyıcının yapısı
ABC taşıyıcıların temel yapısal birimi, altı transmembran bölümü izleyen bir ATP-bağlayan kasetten ibarettir. Plazma zarı taşıyıcılarında (şekilde görülen MDR taşıyıcıda olduğu gibi), bu birimlerden iki tanesi birleşir ve taşıyıcı, 12 transmembran bölge ve iki ATP-bağlayan bölge içerir.

Ca^{2+}'un hücre içindeki bu düşük konsantrasyonu hücreyi, hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki çok küçük artışlara duyarlı kılar. Hücre içi Ca^{2+} düzeyindeki bu kısa süreli ve belli yerlerle sınırlı olan artışlar, daha önce kas kasılması konusuyla ilgili olarak belirtildiği (bkz. Şekil 11.26) ve bir sonraki bölümde tartışılacağı gibi, hücre sinyal iletiminde önemli roller oynar.

Bakteri, maya ve bitki hücrelerinin plazma zarlarındaki benzer iyon pompaları H^+'un hücre dışına aktif taşınmasından sorumludur. Ayrıca, mide içini kaplayan hücrelerden de H^+ aktif olarak dışarı pompalanır ki bu, gastrik sıvının asiditesinin nedenidir. Lizozom ve endozomların içerisine H^+'un taşınmasından farklı yapıdaki pompalar sorumludur (bkz. Şekil 9.38). Üçüncü bir H^+ pompa tipi örneği de, kloroplast ve mitokondrilerdeki ATP sentaz'lardır: Bu pompalar, iyonların elektrokimyasal gradiyent yönünde hareketinin ATP sentezini desteklemek için kullanıldığı, ters yönde çalışan pompalardır.

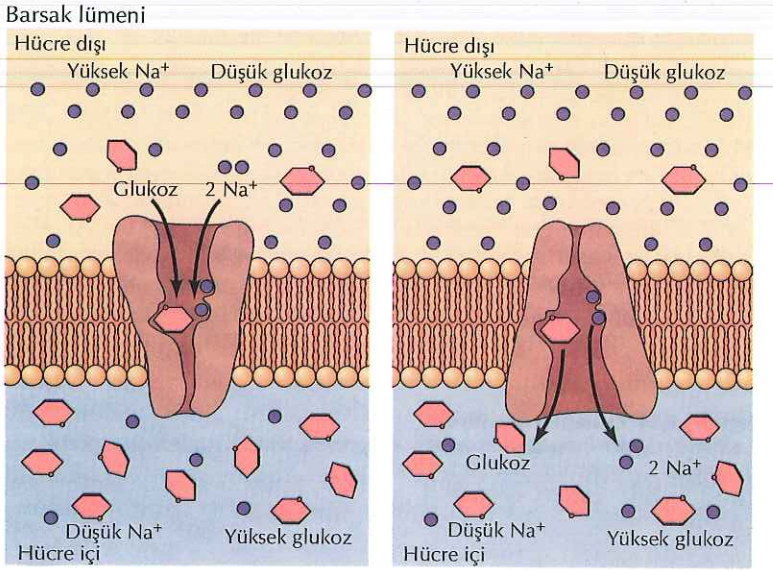
Zar taşıyıcıların en büyük ailesini, yüksek oranda korunmuş ATP-bağlama bölgeleri ya da ATP-bağlama kasetleri ile nitelendirildikleri için **ABC taşıyıcılar** adı verilen grup oluşturur (Şekil 12.31). Prokaryot ve ökaryot hücrelerde, ailenin yüzden fazla üyesi tanımlanmıştır. Bakterilerde, ABC taşıyıcılar, iyonlar, şekerler ve amino asitler gibi çok çeşitli molekülleri ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak taşırlar. Ökaryot hücrelerde ilk ABC taşıyıcı, kanser hücrelerini kemoterapide kullanılan bir çok ilaca dirençli kılan bir genin (çoklu ilaç (multidrug) direnç geni ya da *mdr* geni olarak bilinir) ürünü olarak keşfedilmiştir. Şu ana kadar iki MDR taşıyıcı tanımlanmıştır. Bunlar, çeşitli hücrelerde normal olarak eksprese edilirler ve toksik potansiyeli olan yabancı maddelerin uzaklaştırılmasında görevlidirler. Örneğin, beyindeki kapiller endotel hücrelerinde bir MDR taşıyıcının ekspresyonu, beynin, toksik kimyasallardan korunmasında önemli rol oynar. Ne yazık ki, MDR taşıyıcılar kanser hücrelerinde genellikle yüksek oranda eksprese olduklarından, birçok ilacı tanıyarak hücreden dışarı atar ve böylece, kanser hücrelerinin geniş bir spektrumdaki kemoterapi maddelerine karşı direnç geliştirmelerine neden olarak, kanserin başarıyla sağaltılmasının önünde önemli bir engel oluştururlar.

ABC taşıyıcılar ailesinin tıbbi açıdan önemli diğer bir üyesi de kistik fibrozis'den sorumlu olan gendir. Bu genin ürünü (kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici = cystic fibrosis conductance regulator, ya da CFTR olarak adlandırılır) ABC ailesi üyesi olmasına karşın epitel hücrelerinde Cl^- kanalı olarak çalışır ve hatalı Cl^- taşınımı bu hastalığın özelliğidir. CFTR Cl^- kanalı, açılmak için hem ATP hidrolizi hem de cAMP-bağımlı fosforillenme gereksinimi ile de olağan dışıdır. CFTR'nin denetlenen bir iyon kanalı olarak çalışmasının altında yatan yapısal özelliği ileriki araştırmalarla çözümlenecektir.

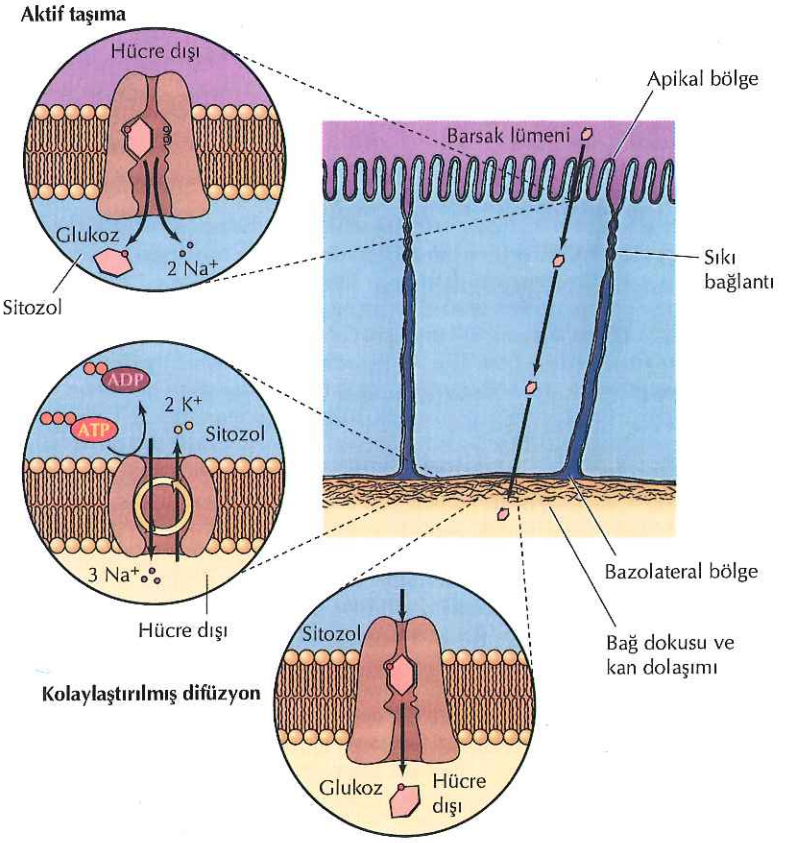
İyon Gradienti ile Yürütülen Aktif Taşıma

Bir önceki kısımda tartışılan iyon pompaları ve ABC taşıyıcılar, molekülleri elektrokimyasal gradiyentlerine aykırı yönde taşımak için, direkt olarak ATP hidrolizinden çıkan enerjiyi kullanırlar. Diğer moleküller konsantrasyon gradiyentlerine aykırı olarak, ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi değil, ikinci bir molekülün enerjetik olarak olumlu yönde, eşlikli taşınmasından elde edilen enerjiyi kullanarak taşınırlar. Na^+- K^+ pompası ile oluşturulan Na^+ gradiyenti, memeli hücrelerinde; şekerlerin, amino asitlerin ve iyonların aktif taşınımını besleyen bir enerji kaynağı sağlar. Bakteri, maya ve bitki hücrelerindeki H^+ pompalarının oluşturduğu H^+ gradiyenti de benzer rol oynar.

Barsak iç yüzeyini kaplayan epitel hücreleri, Na^+ gradiyenti ile yürütülen aktif taşımaya iyi bir örnek oluşturur. Bu hücreler, besinlerdeki şeker ve amino asitleri barsak lümeninden almak için, plazma zarlarının apikal kısımlarındaki aktif-taşımadan yararlanırlar. Örneğin, glukoz alımı, iki Na^+ ile bir glukozu koordine şekilde hücre içine taşıyan bir taşıyıcı tarafından gerçekleştirilir (Şekil 12.32). Na^+'un elektrokimyasak gradiyente uygun akışı, besin glukozunun alınması ve hücre içerisinde yüksek glukoz konsantrasyonunun birikimi için gerekli enerjiyi sağlar. Daha sonra glukoz, barsak



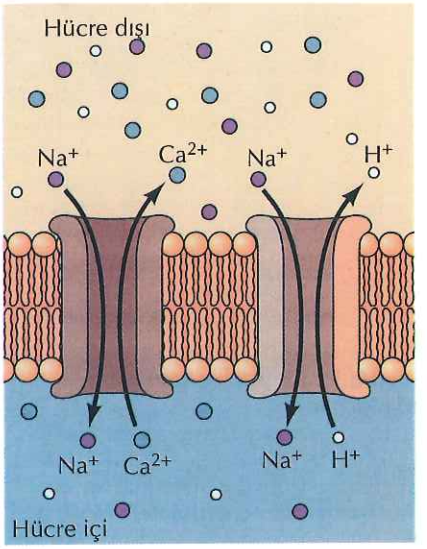
Şekil 12.32 Glukozun aktif taşınımı
Glukozun barsak lümeninden alınmasından, Na^+ gradiyentiyle desteklenen aktif taşıma sorumludur. Taşıyıcı, iki Na^+ ve bir glukozu eşgüdümlü olarak bağlar ve hücre içine taşır. Na^+'un enerjetik olarak uygun yönde taşınımı, glukozun konsantrasyon gradiyentine karşı alınımını destekler.



Şekil 12.33 Barsak epitel hücrelerinde glukoz taşınımı
Plazma zarının apikal kısmındaki bir taşıyıcı, glukozun barsak lümeninden aktif olarak alınmasından (Na^+ ile birlikte) sorumludur. Sonuç olarak besin glukozu emilir ve barsak epitel hücreleri içinde biriktirilir. Glukoz daha sonra, plazma zarının bazolateral kısmındaki bir taşıyıcı tarafından kolaylaştırılmış difüzyonla, bu hücrelerden alttaki bağ dokusuna ve kan dolaşımına aktarılır. Sistem, yine bazolateral kısımda bulunan Na^+- K^+ pompası ile desteklenir. Glukozun sindirim kanalından alınıp dolaşıma aktarılmasının, aktif taşıma ile kolaylaştırılmış difüzyona aracılık eden glukoz taşıyıcıların, sırasıyla, plazma zarının apikal ve bazolateral bölümlerinde sınırlı yerleşimlerine bağlı olduğuna dikkat edin.

epitelinin bazolateral yüzeyinden alttaki bağ dokusuna (kan kapilerleri içerir), konsantrasyon gradiyentine uygun yönde, kolaylaştırılmış difüzyonla bırakılır (Şekil 12.33). Glukozun barsak lümeninden alımı ve dolaşıma bırakılması epitel hücrelerinin, aktif taşıma ve kolaylaştırılmış difüzyon taşıyıcılarının özellikle plazma zarının, sırasıyla, apikal ve bazolateral kısımlarına yerleşmesinden kaynaklanan, polarize fonksiyonuna güzel bir örnektir.

Glukoz ile Na^+'un eşgüdümlü alınımı, iki molekülün aynı yönde taşınması anlamına gelen **simport**'a örnektir. Bunun aksine, glukozun kolaylaştırılmış difüzyonu **uniport** yani tek molekülün taşınmasına örnektir. Aktif taşıma, iki molekülün zıt yönlere taşınması, yani **antiport** şeklinde de görülür (Şekil 12.34). Örneğin, Ca^{2+} hücreden, sadece Ca^{2+} pompasıyla değil, ayrıca Na^+'u hücre içine alırken Ca^{2+}'u dışarı taşıyan bir Na^+- Ca^{2+} antiporteri ile de çıkartılır. Diğer bir örnek, hücre içi pH'nın kontrolüyle görevli olan Na^+- H^+ değiş tokuş proteinidir. Na^+- H^+ antiporteri, Na^+'un hücre içine alımını H^+'un hücre dışına gönderilmesiyle birleştirir ve böylece, metabolik reaksiyonlarla oluşan H^+'nun fazlasını uzaklaştırarak sitoplazmanın asitleşmesini önler.



Şekil 12.34 Antiport örnekleri
Ca^{2+} ile H^+'un hücreden çıkışları, bunu, Na^+'un enerjetik olarak desteklenen hücre içine girişiyle eşgüdümleyen antiporterler tarafından sağlanır.

MOLEKÜLER TIP

Kistik Fibrozis

Hastalık

Kistik fibrozis, çocukları ve genç erişkinleri etkileyen çekinik bir genetik hastalıktır. Diğer ırklarda nadir olmakla birlikte, 2 500 yenidoğandan birinin etkilendiği beyaz ırkta en sık kalıtılan ölümcül hastalıktır. Kistik fibrozisin karakteristik özelliği, solunum ve sindirim kanallarını kaplayan hücreler dahil bir çok epitel hücre çeşidinin anormal derecede yoğun ve yapışkan bir mukus üretmeleridir. İlk klinik belirtisi, akciğer hava yollarının kalın bir mukus tıkacıyla tıkanması ve bunu izleyen, tekrarlayan bakteri enfeksiyonları sonucunda ortaya çıkan bir solunum rahatsızlığıdır. Pankreas kanallarının tıkanması nedeniyle bir çok hastada pankreas da işe karışır. Ter bezlerinin çalışması da anormaldir ve terdeki aşırı tuz kistik fibrozisi tanımlar.

Hastalığa şu anki yaklaşım, bronşların boşalmasını kolaylaştıran fizik tedaviyi, antibiyotik kullanımını ve pankreas enzim replasmanını kapsar. Bu uygulamalar her ne kadar hastanın yaşamını 30 yaşına kadar uzatıyorsa da, sonuçta kistik fibrozis öldürücüdür ve ölümlerin %95'inden akciğer hastalığı sorumludur.

Moleküler ve Hücresel Temel

Kistik fibrozisin belirtisi, ter kanallarının ve solunum sisteminin iç yüzeyini kaplayanlar da dahil etkilenmiş epitel dokulardaki Cl^- taşınım bozukluğudur. Kistik fibrozis hastalarının epitel hücrelerindeki Cl^- kanallarının normal çalışamadıkları 1984'de gösterildi. Hastalığın moleküler temeli, kistik fibrozis geninin 1989'da bir moleküler klon olarak izole edilmesiyle aydınlatıldı. Genin dizin analizi, ABC taşıyıcı ailesinden bir proteini (kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici= cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR olarak adlandırıldı) kodladığını gösteriyordu. Sonraki çeşitli araştırmalar, CFTR'nin Cl^- kanalı olarak işlev gördüğünü ve kistik fibrozisden sorumlu mutasyonun direkt olarak hatalı Cl^- taşınımına sebep olduğunu gösterdi.

Önlem ve Tedavi

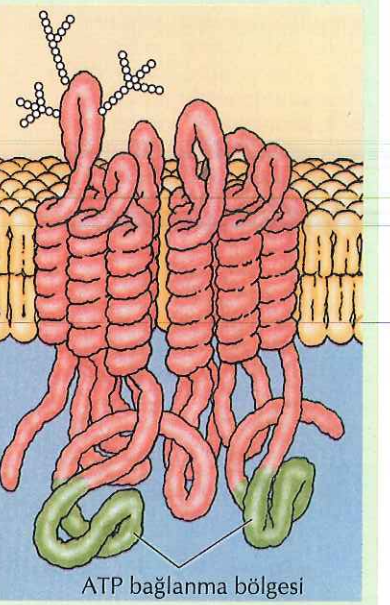
Diğer kalıtılan hastalıklarda da olduğu gibi, kistik fibrozis geninin izolasyonu, mutant allel taşıyan bireylerin belirlenmesi için genetik tarama olasalığını gündeme getirdi. Bazı toplumlarda mutant genlerin heterozigot taşıyıcı sıklığının 25 bireyde bir gibi yüksek olması, riskli çiftlerin belirlenmesi ve genetik danışma sağlanması için genel toplum taramasının gereğine işaret eder. Ayrıca, bir Cl^- kanalı olarak CFTR'nin işlevinin anlaşılması tedavi için yeni yaklaşımları belirlemiştir. Olasılıklardan biri, etkilenen epitellerdeki diğer Cl^- kanallarını açacak ilaçların kullanımıdır. Alternatif olarak gen tedavisi, kistik fibrozisli hastaların solunum epitelinde mutant genin yerine normal CFTR geninin yerleştirilmesi olanağını sunar.

Kistik fibrozis hastalarının kültürdeki hücrelerine normal CFTR geninin verilmesiyle Cl^- kanal fonksiyonlarının yerine geldiğini gösteren araştırmalar gen tedavisinin etkinliğini desteklemektedir. Kistik fibrozda gen tedavisi uygulanması olanağı, hava yollarını kaplayan epitel hücrelerine'aerosol' sistemle ulaşılabilme kolaylığı nedeniyle yüksektir. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, viral vektörlerin CFTR cDNA sını solunum epiteline aktarabildiklerini göstermiş ve kistik fibrozis için gen tedavisinin insanda ilk denemesi 1993'de başlatılmıştır. Bu güne kadar yapılan denemeler, CFTR'nin kistik fibrozisli hastaların bronş epitel hücrelerine, güvenli bir şekilde, aktarılabildiğini ve eksprese olduğunu göstermiştir. Ancak, şu ana kadar, gen transfer etkinliği düşük olmuş ve aktarılan CFTR cDNA'sının ekspresyonu bir aydan daha az sürmüştür. Sonuçta, başarılı gen transferi yöntemi geliştirilmiş, ancak, etkin bir gen tedavi protokolu oluşturulmasının önündeki ciddi engeller ortadan kaldırılamamıştır.

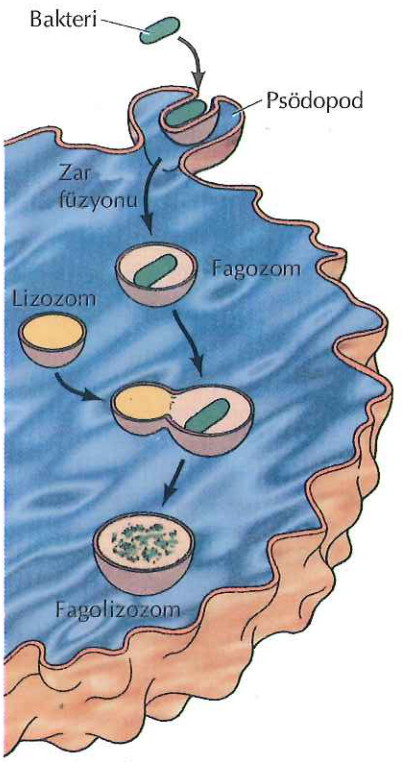
Kaynaklar

Collins, F. S. 1992. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774-779.

Driskeli, R. R. and J. F. Engelhardt. 2003. Current status of gene therapy for inherited lungdisease. *Ann. Rev. Physiol.* 65:585-612.



Kistik fibrozis transmembran iletim düzenleyici (CFTR) modeli.



Şekil 12.35 Fagositoz
Bakterinin, hücre yüzeyine bağlanması, sonunda bakteriyi saracak olan bir psödopodun gelişimini uyarır. Psödopod zarlarının birbirine kaynaşması sonucunda büyük bir hücre içi vezikül (fagozom) oluşur. Fagozom lizozomlarla birleşerek, içerisinde yutulan bakterinin sindirileceği bir fagolizozom oluşturur.

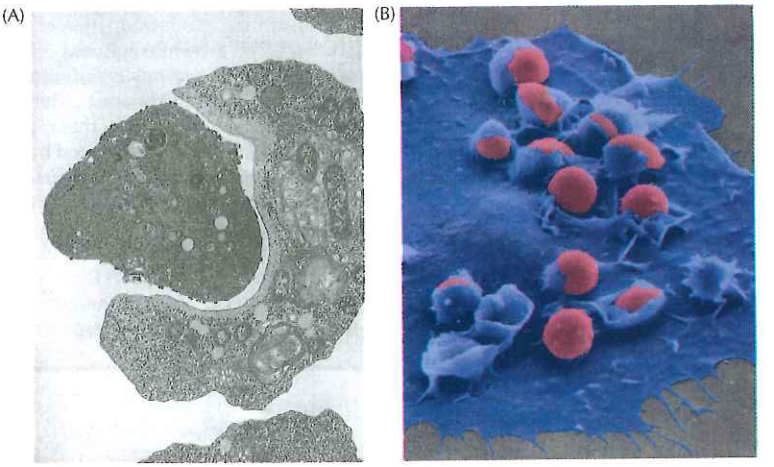
Endositoz

Daha önce bahsedilen taşıyıcı ve kanal proteinleri, küçük molekülleri fosfolipid çift tabakadan geçirirler. Ökaryot hücreler aynı zamanda, **endositoz** denilen farklı bir yöntemle, çevresel ortamdaki makromolekülleri ve partikülleri de alabilirler. Endositozda, içeri alınacak olan madde plazma zarının bir bölümü tarafından kuşatılır ve zar, alınan maddeyi kapsayan bir vezikül oluşturmak üzere hücre içine doğru tomurcuklanır. Christian deDuve 1963'de "Endositoz" terimini, hem büyük partiküllerin (bakteri gibi) yutulması hem de, küçük veziküller içerisinde sıvıların veya makromoleküllerin alınması için, ikisini de kapsamak üzere kullanmıştır. Bu aktivitelerden ilki **fagositoz** (hücrenin yemesi) ve sonraki de **pinositoz** (hücrenin içmesi) olarak bilinmektedir.

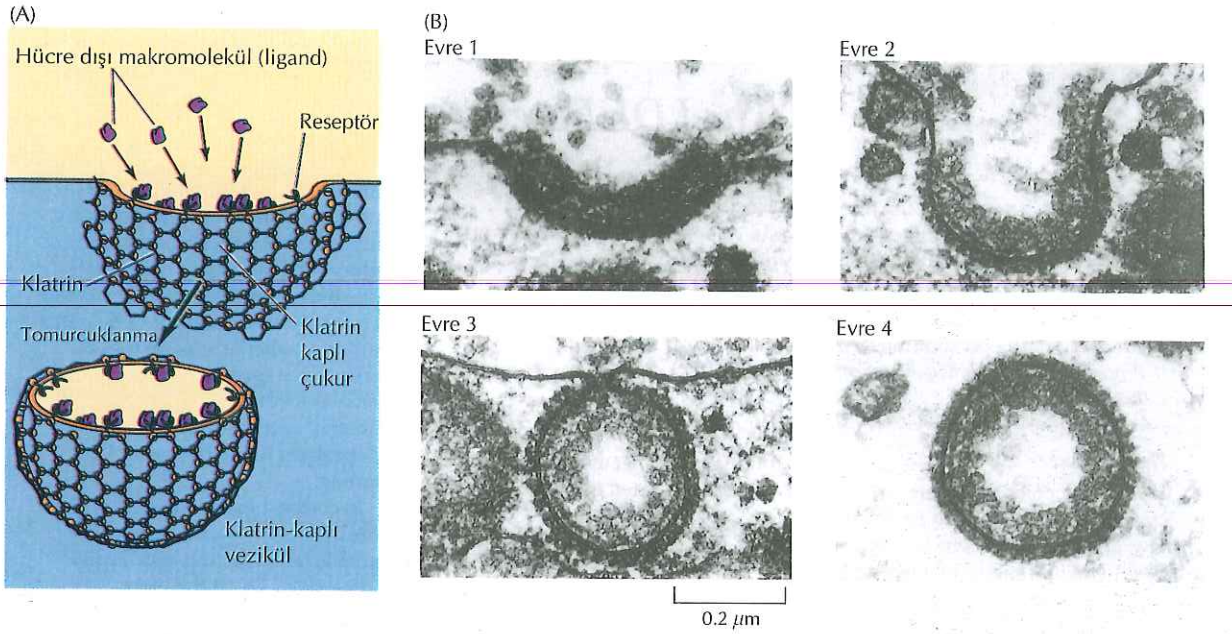
Fagositoz

Fagositoz sürecinde hücre; bakteriler, hücre kalıntıları veya hatta bütün bir hücre gibi büyük partikülleri içine alır (Şekil 12.35). Fagositik hücrenin yüzeyindeki reseptöre partikülün bağlanması, Bölüm 11'de ele alınan ve hücre yüzeyinin aktine-dayalı hareketlerinden biri olan, psödopod (yalancı ayak) oluşumunu tetikler. Bunun sonucunda, psödopod, partikülü kuşatır ve fagozom olarak adlandırılan büyük bir hücre içi vezikül (>0.25µm çapında) oluşturmak üzere zarları birleşir. Fagozomlar daha sonra lizozomlarla **birleşerek** fagolizozomları oluştururlar ki, içerisinde kalan partikül asit hidrolazların etkisiyle sindirilir (Bölüm 9'a bakınız). Fagolizozom olgunlaşması sırasında içeri alınmış olan zar proteinlerinden bir kısmı, birazdan reseptör-aracılıklı endositoz için belirtildiği gibi, plazma zarına geri döner.

Büyük partiküllerin fagositozla hücre içine alınması farklı tip hücrelerde farklı roller oynar (Şekil 12.36). Amiblerin çoğu fagositozu, bakteri ya da diğer protozoalar gibi besin partiküllerini yakalamak için kullanır. Çok hücreli hayvanlarda fagositozun en önemli rolü, istila eden mikroorganizmala karşı savunma veya, yaşlı ya da hasarlı hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Memelilerde fagositoz esas olarak iki beyaz kan hücresinin, genellikle "profesyonel



Şekil 12.36 Fagositik hücre örnekleri
(A) Diğer bir protisti yutan bir amib. (B) Kırmızı kan hücrelerini içeri alan makrofajlar. Mikrofotograflar yapay olarak renklendirilmiştir. (A, R.N. Band and H.S. Pankratz/Biological Photo Service; B, Joel Swanson'dan.)



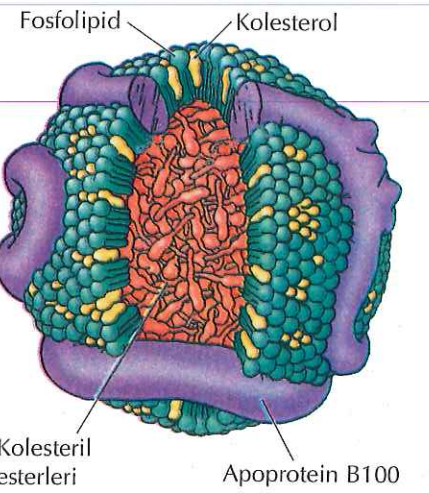
Şekil 12.37 Klatrin-kaplı vezikül oluşumu
(A) Hücre dışındaki makro moleküller (ligandlar) klatrin-kaplı çukurlarda toplanmış olan hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Bu çukurlar plazma zarından tomurcuklanarak hücre içerisinde klatrin-kaplı vezikülleri oluştururlar. (B) Klatrin-kaplı çukurlardan klatrin-kaplı veziküllerin oluşumunun dört aşamasını gösteren elektrom mikroskop fotografları. (B, M.M. Perry, 1979. *J. Cell Science* 34:266)

fagositler" olarak adlandırılan makrofaj ve nötrofillerin fonksiyonudur. Makrofaj ve nötrofillerin her ikisi de enfekte dokulardan mikroorganizmaları uzaklaştırarak, vücudun savunma sisteminde çok önemli rol oynarlar. Makrofajlar ayrıca, vücuttaki dokulardan yaşlı ve ölü hücreleri temizler. Bu aktivite konusunda etkileyici bir örnek, insan dalak ve karaciğer dokusundaki makrofajların günde 10^{11} den fazla yaşlı kan hücresinin yok edilmesinden sorumlu olmalarıdır.

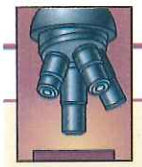
Reseptör- Aracılıklı Endositoz

Sadece özgün işlev gören fagositozun aksine pinositoz ökaryot hücreler arasında genelleşmiştir. Bu işlemin en iyi tanımlanmış olan formu, özel makromoleküllerin seçilerek içeri alınmasını sağlayan **reseptör-aracılıklı endositoz** dur (Şekil 12.37). İçeri alınacak olan makro moleküller önce hücre yüzeyindeki özel reseptörlere bağlanırlar. Bu reseptörler, plazma zarındaki **klatrin-kaplı çukurlar** denilen özel bölgelerde toplanırlar. Bu çukurlar zardan tomurcuklanarak, reseptörleri ve bağlı makro molekülleri (ligand) içeren, küçük, **klatrin- kaplı vezikülleri** oluştururlar. Klatrin-kaplı veziküller daha sonra erken endozomlarla birleşir ve burada, içeriği, lizozoma aktarılmak ya da plazma zarına geri gönderilmek üzere ayrılır.

Memeli hücreleri tarafından kolesterolün alınımı, reseptör-aracılıklı endositozun moleküler düzeyde anlaşılmasında anahtar model olmuştur. Kolesterol, kan dolaşımında lipoprotein partikülleri şeklinde



Şekil 12.38 LDL'nin yapısı
Her LDL partikülü yağlı bir çekirdek bölgesinde, yaklaşık olarak 1500 kolesteril ester molekülü içerir. Çekirdek, 500 kolesterol molekülü, 800 fosfolipid molekülü ve bir apoprotein B100 molekülünden oluşan bir kılıfla kaplıdır.



ANAHTAR DENEY

LDL Reseptörü

Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity

Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein
University of Texas Southwestern Medical School, Dallas

Proceedings of the National Academy of Science USA, 1974, Volume 71, pages 788-792

Bağlam

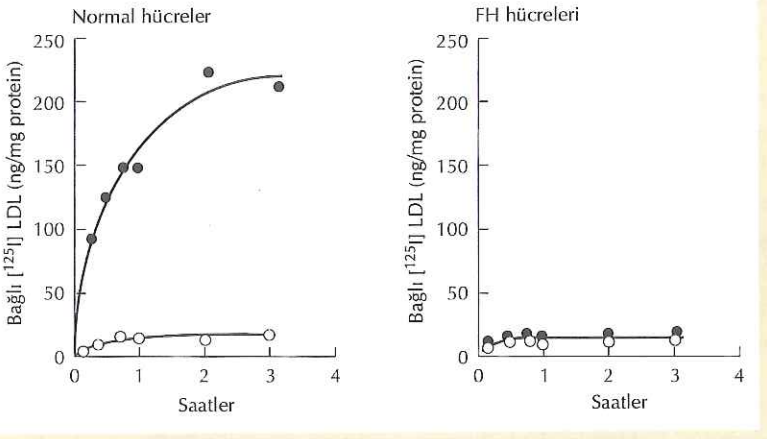
Ailesel hiperkolesterolemi (FH) genetik bir hastalıktır, hastalar çok yüksek serum kolesterol düzeyine sahiptir ve yaşamlarının erken döneminde kalp krizi riski taşırlar. Michael Brown ve Joseph Goldstein 1972'de, aşırı kolesterol üretiminin kolesterol biyosentezini düzenleyen kontrol mekanizmasındaki bir bozukluktan kaynaklandığı düşüncesinden yola çıkarak, bu hastalığı anlama çabalarını başlattılar. Bu hipotezle tutarlı olarak, insan normal fibroblast kültür ortamına LDL eklenmesinin, kolesterol biyosentez yolunda hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi -3- metilglutaril koenzim A redüktaz'ı (HMG-CoA redüktaz) inhibe ettiğini buldular. Bunun aksine, FH hastalarının hücrelerine LDL ilavesi HMG-CoA redüktaz aktivitesini etkilemedi ve FH hücreleri aşırı kolesterol üretti.

Bunu izleyen deneyler, sürpriz bir şekilde, HMG-CoA redüktaz aktivitesindeki bu anormalliğin HMG-CoA redüktaz genindeki bir mutasyondan kaynaklanmadığını gösterdi. HMG-CoA redüktaz denetimindeki bu anormalliğin, FH hücrelerinin LDL'den kolesterolü ayıramamasından kaynaklandığı anlaşıldı. Brown ve Goldstein 1974'de, FH hücrelerindeki aksaklığın, hücre yüzeyindeki reseptöre LDL bağlanma hatası olduğunu gösterdiler. LDL reseptörünün tanımlanması temelleri sarsan bir dizi araştırmaya yol açtı, Brown, Goldstein ve arkadaşları reseptör- aracılıklı endositoz yolunu betimlediler.

Deneyler

Brown ve Goldstein 1974'de yayınladıkları makalelerinde, normal bireylerin ve FH hastalarının fibroblastlarına radyoaktif işaretli LDL'nin bağlanmasını inceledikleri araştırmanın sonuçlarını yayınladılar. Kültür ortamına az miktarda, radyoaktif LDL eklenmesinden sonra, değişik inkübasyon sürelerinde hücrelere bağlanan radyoaktivite miktarı saptandı (şekle bakınız). İnkübasyon süresine bağlı olarak normal hücrelere artan miktarlarda radyoaktif LDL bağlandı. Önemli nokta, fazla miktarda işaretsiz LDL eklendiğinde radyoaktif LDL bağlanmasının azaltmasıydı ki bu, LDL'nin hücre yüzeyinde sınırlı sayıdaki bölge ile özgül etkileşime girerek bağlandığını gösteriyordu. Etkileşimin özgüllüğü daha sonra, diğer lipoproteinlerin aşırı miktarlarının dahi LDL bağlanmasını engelleyememesiyle belirlendi.

Normal fibroblastlarla elde edilen bu sonuçlara karşın FH hastalarına ait fibroblastlar radyoaktif LDL'yi özgül olarak bağlayamadı. Böylece, normal fibroblastların, FH hücrelerinde bulunmayan ya da kusurlu olan, özgül bir LDL reseptörüne sahip oldukları anlaşıldı. Brown ve Goldstein, FH hücrelerinde gözlenen LDL bağlanma hatasının "bu hastalıktaki primer genetik bozukluğu gösterdiğine", LDL'nin HMG-CoA redüktazı inhibe edememesine ve böylece aşırı kolesterol üretimine neden olduğuna karar verdiler. Ek araştırmalar, normal fibroblastlara bağlanan LDL'nin, hücrenin zar fraksiyonunda bulunduğunu ve bunun da LDL reseptörünün bir hücre yüzey proteini olduğuna işaret ettiğini gösterdi.

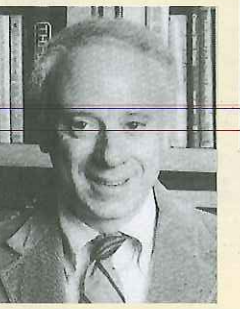


Normal ve FH hücrelerine radyoaktif LDL bağlanmasının zamana göre dağılımı. Hücreler, bol, işaretsiz LDL varlığında (açık sembol) ve yokluğunda (kapalı sembol) radyoaktif [125I]LDL ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler toplanarak bağlanan radyoaktif LDL miktarı belirlendi. Veriler, miligram hücre proteini başına, nanogram bağlı LDL olarak sunuldu.

Etki

LDL reseptörünün tanımlanmasını takiben Brown ve Goldstein, hücre yüzeyine bağlanan LDL'nin süratle içeri alındığını ve lizozomlarda serbest kolesterole yıkıldığını gösterdiler. Daha sonra, Richard Anderson ile birlikte, LDL reseptörünün kaplı çukurlardan endositozla hücre içine alındığını kanıtladılar. Ayrıca, daha önceki çalışmaları LDL reseptörünün, hücre içinde ligandını bırakarak plazma zarına geri döndüğünü gösterdi.

Böylece, kolesterol biyosentezini anlayabilmek amacıyla başlatılan çalışmalar, ökaryot hücrelerin makro molekülleri almak için kullandıkları çok önemli bir yolağın anlaşılmasına yol açtı ki bu, bilmi ve bilim adamlarını beklenmedik, ancak heyecan verici yeni hedeflere yönlendiren yollara güzel bir örnektir.



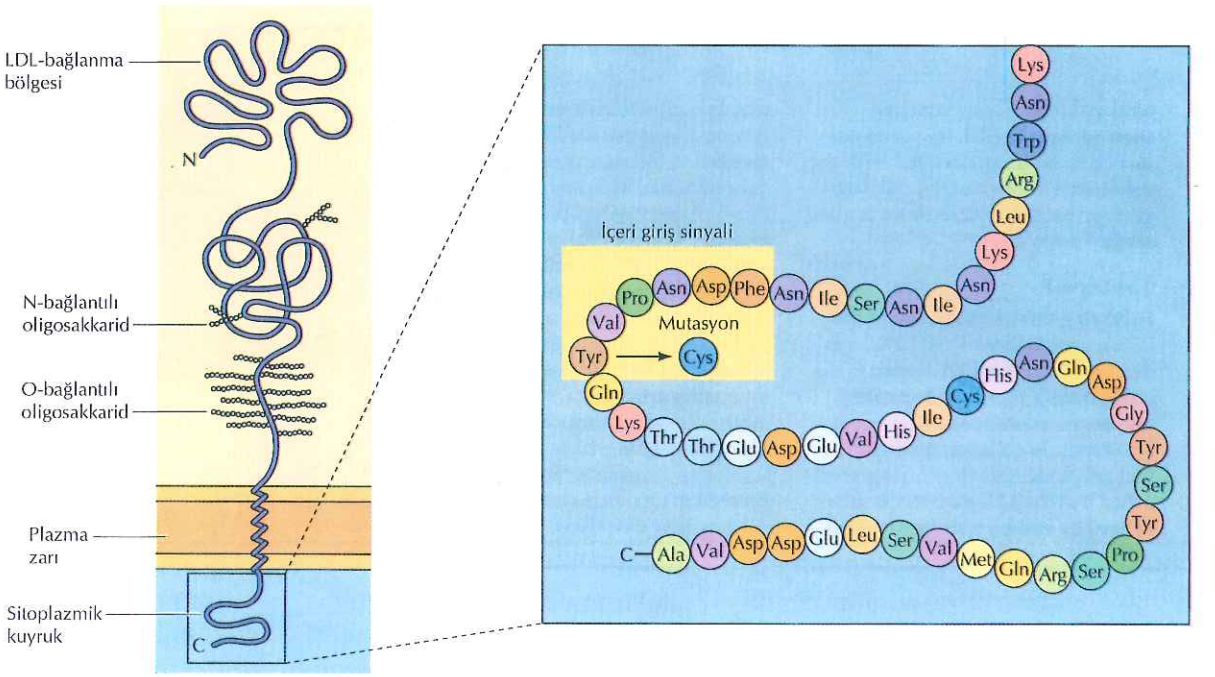
Joseph Goldstein

Michael Brown

taşınır ki, bunların en yaygın olanı **düşük-yoğunluklu lipoprotein** ya da **LDL** olarak bilinir (Şekil 12.38). Michael Brown ve Joseph Goldstein'in laboratuvarlarındaki çalışmalar, LDL'nin memeli hücreleri tarafından alınımı için, LDL'nin klatrin-kaplı çukurlarda toplanmış olan özel hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasının ve endositozla içeri alınmasının gerektiğini ortaya koymuştur. Bir sonraki bölümde anlatıldığı gibi, reseptör daha sonra tekrar hücre zarına gönderilirken, LDL lizozomlara aktarılır ve burada kolesterol hücre tarafından kullanılmak üzere serbestleşir.

Bu olayın ana hatlarının kavranması, kalıtılan ve ailesel hiperkolesterolemi olarak bilinen bir hastalığa sahip hastaların çalışılmasıyla sağlandı. Bu hastalığı taşıyan kişiler çok yüksek serum kolesterolüne sahip olup, yaşamın erken döneminde kalp kriziyle yüzleşirler. Brown ve Goldstein bu hastaların hücrelerinin, hücre dışı sıvıdan LDL'yi alamadıklarını, bu nedenle dolaşımda yüksek oranda kolesterol biriktiğini buldular. Daha sonraki çalışmalar, normal bireylerin hücrelerinin LDL için bir reseptöre sahip olduklarını, bunların kaplanmış çukurlarda toplandıklarını ve ailesel hiperkolesteroleminin LDL reseptöründeki kalıtılan mutasyonlardan kaynaklandığını gösterdi. Bu mutasyonlar iki tipdi. Ailesel hiperkolesterolemili hastaların çoğunun hücreleri, LDL alımı için özel bir yüzey reseptörünün gerektiğini gösterecek şekilde, LDL bağlama konusunda yetersizdi. Bunun dışında, hücreleri LDL'yi bağlayan ancak içeri alamayan birkaç hasta tanımlandı. Bu hastaların LDL reseptörlerinin kaplanmış kanallarda yoğunlaşamaması, kaplı kanalların reseptör-aracılıklı endositozda oynadıkları rolün önemini kanıtlıyordu.

LDL reseptörünün kaplı kanallarda toplanmasını engelleyen mutasyonlar reseptörün sitoplazmik kısmında bulunur ve tek bir tirozinin sisteine dönüşmesi gibi, fark edilmesi çok zor olabilir (Şekil 12.39). Daha ileri çalışmalarla, LDL reseptörünün alınma sinyali, esas tirozin dahil, altı amino asitlik bir dizi olarak belirlendi. Genellikle tirozin içeren benzer giriş sinyalleri, klatrin- kaplı çukurlar aracılığıyla hücre içine alınan diğer reseptörlerin sitoplazmik uzantılarında da bulundu. Lizozomal hidrolazların *trans* Golgi ağından taşınması

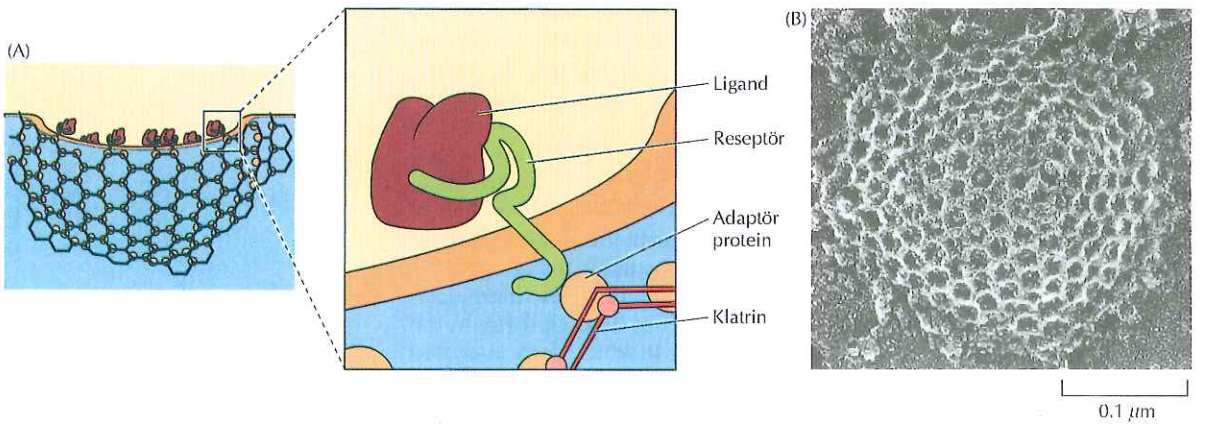


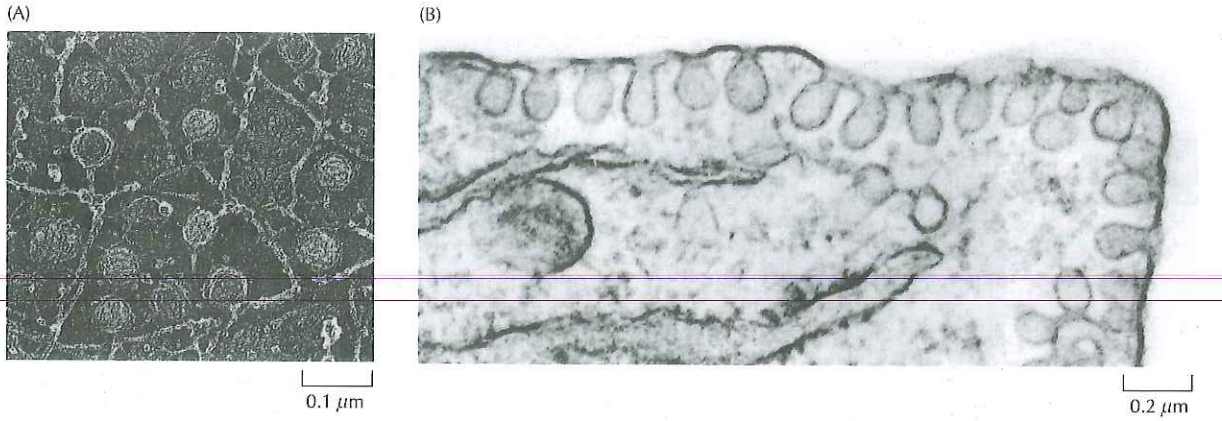
Şekil 12.39 LDL reseptörü
LDL reseptörü; hücre dışında 700 amino asit, 22 amino asitlik bir transmembran α sarmal ve 50 amino asitlik bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. N-ucundaki 292 amino asit LDL-bağlama bölgesini oluşturur. Sitoplazmik uzantıdaki altı amino asit, ilk kez ailesel hiperkolestrolemide Tyr'in Cys'e mutasyonunun reseptörün kaplı çukurda toplanmasını engellemesiyle farkedilen, içeri giriş sinyalini tanımlar.

sırasında klatrin-kaplı veziküllerin oluşmasına benzer şekilde, içeri giriş sinyalleri adaptör proteinlere, onlar da zarın sitoplazmik yanındaki klatrine bağlanır (bkz. Şekil 9.33). Klatrin, zarın biçimini bozan, sepete benzer bir yapıda birleşir ve içeri doğru ilerleyen çukurlar oluşturur (Şekil 12.40). Dinamin adı verilen GTP- bağlayan bir protein, içeri doğru ilerleyen bu çukurların boyun kısımlarının çevresinde halka oluşturur ve nihayet, kaplı veziküllerin hücre içerisine serbest kalmasını sağlar.

Reseptör-aracılıklı endositoz, ökaryot hücresi plazma zarlarının en önemli aktivitelerindendir. Yirmiden fazla, farklı reseptörün seçili

Şekil 12.40 Klatrin-kaplı çukurların oluşumu
(A) Adaptör proteinler hem klatrine hem de reseptörlerin sitoplazmik uzantılarında bulunan içeri giriş sinyallerine bağlanır. (B) Klatrin ağının oluşturduğu sepet benzeri yapıyı gösteren, bir klatrin-kaplı çukura ait elektron mikroskop görüntüsü. (B, John E. Heuser'in katkısı, Washington University School of Medicine)





Şekil 12.41 Kaveola
Kaveolaya ait elektron mikroskop görüntüleri. (A, John E. Heuser'in katkısı, Washington University School of Medicine; B, R.G.W. Anderson'un katkısı/ University of Texas Southwestern Medical School, Dallas)

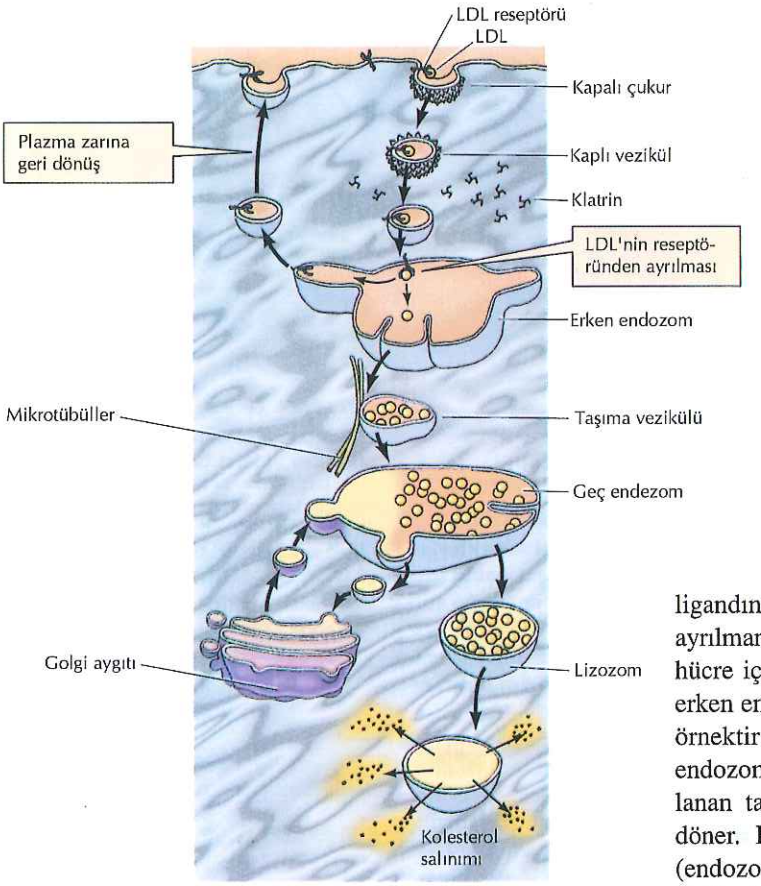
olarak bu yolla içeri alındığı gösterilmiştir. Plazma zarından tomurcuklanmaları sırasında kaplı vezikül içerisine hücre dışı sıvısı da girer, bu nedenle, reseptör-aracılıklı endositoz, özgül makro moleküllerin içeri girişi sırasında hücre dışı sıvıların ve içeriklerinin de alınmasına neden olur **(sıvı fazlı endositoz).** Kaplı çukurlar tipik olarak, plazma zarının yüzey alanının %1 ila 2 sini kaplar ve tahmini ortalama var oluş süreleri 1 ila 2 dakikadır. Bu değerlere göre yaklaşık olarak her 2 saatte bir, plazma zarının tamamına eşdeğer büyüklükte hücre yüzey alanının reseptör-aracılıklı endositozla içeri alındığı hesaplanabilir.

Çeşitli araştırmalar hücrelerin, klatrinden-bağımsız endositoz yollarına da sahip olduklarını belirtmektedir. Örneğin, klatrin kaplı çukurlarla endositozun engellendiği deney koşullarında, sıvıların ve zara bağlı bazı moleküllerin endositozu devam eder. Klatriden-bağımsız endositoz yollarından biri, moleküllerin **kaveola** denilen küçük (50 ila 80 nm çapında), zar girintileri içerisinde alınmasıdır (Şekil 12.41). Ayrıca, büyük veziküller de (0.15 ila 5 μm çapında) **makropinositoz** denilen bir olayla sıvıların alınmasını sağlayabilir. O halde, klatrin- bağımlı endositoz, açık bir şekilde, hem sıvıların hem de özel makro moleküllerin alınmasında en önemli yol ise de, hücreler, klatrinden-bağımsız bir kaç mekanizmayı da kullanabilir.

Endositozda Protein Trafiği

Klatrin-kaplı veziküller, hücre içine alındıktan kısa bir süre sonra kılıflarını atarak, hücre periferinde tübül şeklinde uzantıları olan erken **endozomlarla** birleşirler. Endositik veziküllerin endozomlarla birleşmesi; GTP-bağlayan Rab proteinleri, bunların efektörleri ile vezikül zarı ve hedef zardaki transmembran, komplementer protein çiftleri (SNARE proteinleri) aracılığıyla gerçekleşir (bkz. Şekil 9.36). Erken endozomlar, endositozla alınan moleküllerin zara geri gönderildiği ya da yıkılmak üzere lizozomlara aktarıldığı tasnif bölmesi görevi yaparlar. Ayrıca, polarize hücrelerin erken endozomları, epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral kısımlarında olduğu gibi, endositozla alınan proteinleri plazma zarının farklı bölümleri arasında devredebilirler.

Erken endozomların önemli bir özelliği, zar H^+ pompasının çalışması sonucu asidik bir iç pH'yı (6.0 ile 6.2 civarında) korumalarıdır. Bu asidik pH, erken endozom bölmesi içerisinde bir çok



Şekil 12.42 Erken endozomlarda ayrım (tasnif)
Reseptörüne bağlanan LDL, kılıfını atıp erken endozomlarla birleşecek olan klatrin-kaplı veziküllerle içeri alınır. Erken endozomun asidik pH'sında LDL reseptöründen ayrılır ve endositozla alınmış olan materyal, lizozomlarda yıkılmak ya da plazma zarına geri dönmek üzere ayrılır. LDL, mikrotübüller boyunca hareket eden büyük, taşıyıcı veziküller içerisinde, erken endozomlardan geç endozomlara taşınır. Golgi aygıtından lizozomal hidrolazları taşıyan veziküller geç endozomlarla birleşerek onları lizozomlara dönüştürürler ve LDL burada yıkılarak kolesterol serbest kalır. Buna karşın, LDL reseptörü erken endozomlardan plazma zarına geri gönderilir.

ligandın reseptöründen ayrılmasına yol açar. Bu ayrılmanın ardından reseptörler ve ligandlar farklı hücre içi hedeflere taşınabilirler. Reseptöründen erken endozom içerisinde ayrılan LDL klasik bir örnektir (Şekil 12.42). Reseptör daha sonra, endozomların tübüler uzantılarından tomurcuklanan taşıma vezikülleriyle plazma zarına geri döner. Buna karşın LDL lizozomlara aktarılır (endozom içerisindeki diğer çözünür içerikle birlikte) ve burada yıkımı ile kolesterol elde edilir.

Bir çok reseptör (LDL reseptörü gibi) bağlı ligandlarını erken endozom içerisinde bırakarak geri döndüğünden, reseptör-aracılıklı endositoz ile alınan zar proteinlerinin plazma zarına geri dönmeleri kaçınılmazdır. Bu reseptörlerin geri dönüşümü ligandlarının sürekli olarak içeri alınmasına neden olur. Örneğin, her LDL reseptörü, yaklaşık olarak her 10 dakikada bir, plazma zarından erken endozoma ve geriye olmak üzere bir tur yapar. Endositozdan kaynaklanan zar trafiğinin yoğunluğu, geri dönüşüm yolağının önemini daha da artırır. Daha önce belirtildiği gibi, her saatte bir, plazma zarının %50'si reseptör-aracılıklı endositozla içeri alınır ve bu nedenle de eşdeğer bir hızla tekrar yerine konmalıdır. Tekrar yerine koyma çoğunlukla reseptör geri dönüşümü ile gerçekleşir; bir saatte hücre yüzeyinin sadece %5 kadarı yeniden sentezlenir.

Lizozomlarda yıkılması hedeflenen ligandlar ve zar proteinleri erken endozomlardan, nükleus yakınında yerleşik geç endozomlara aktarılır (bkz. Şekil 12.42). Erken endozomlardan geç endozomlara aktarım, büyük, endositik taşıma vezikküllerinin mikrotübüller boyunca hareketiyle sağlanır. Geç endozomlar erken endozomlardan daha asidiktirler (pH 5.5 ile 6.0 civarında) ve Bölüm 9'da tartışıldığı gibi, Golgi aygıtından lizozomal hidrolazları taşıyan taşıma vezikülleri ile birleşebilirler. Geç endozomlar böylece, lizozomal enzimlerin

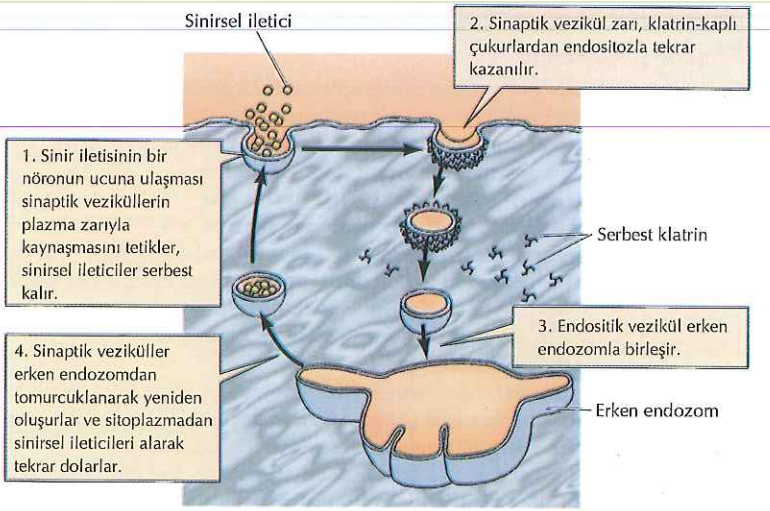
tamamını elde ederek lizozomlara olgunlaşırlar ve daha da asidik hale gelirler (pH 5 civarında). Endositoz ile alınan materyal lizozomların içinde asit hidrolazlar tarafından parçalanır.

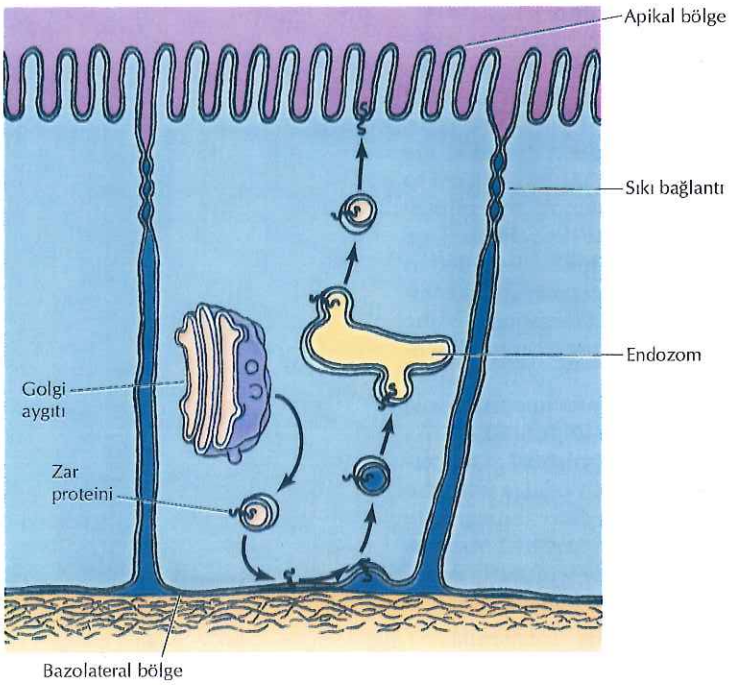
Rreseptörlerin bir çoğunun (LDL reseptörü gibi) plazma zarına geri dönmelerine karşın, yazgısı farklı olanlar da vardır. Bazıları, ligandlarıyla birlikte lizozomlara alınarak yıkılırlar. Örneğin, bazı büyüme faktörlerinin yüzey reseptörleri (bir sonraki bölümde tartışılıyor) büyüme faktörünün bağlanmasını takiben içeri alınır ve sonunda lizozomlarda parçalanırlar. Bu sürecin etkisi, reseptör-ligand kompleksinin plazma zarından uzaklaştırılması ve böylece hücrenin, büyüme faktörü uyarısına yanıtının sonlandırılmasıdır ki bu olgu, **reseptör azaltan regülasyon** olarak bilinir.

Endozomlardan geri dönüşümün özgün bir tipi, sinir impulslarının sinapslar arasında aktarımında önemli rol oynar (Şekil 12.43). Bu bölümde daha önce tartışıldığı gibi, nöronların çoğunun uç kısmına bir aksiyon potansiyelinin ulaşması sinaptik veziküllerin plazma zarıyla kaynaşmasını uyarır ve post sinaptik hücrelere sinyali iletecek olan sinirsel ileticiler serbest kalır. Boşalan sinaptik veziküller, erken endozomlarla birleşecek olan klatrin-kaplı veziküller içerisinde plazma zarından uzaklaştırılır. Sinaptik veziküller daha sonra, direkt olarak endozomlardan tomurcuklanarak yeniden oluşurlar. Yeni sinirsel iletici biriktirerek, bir sonraki sinaptik iletim döngüsüne hazır olmak üzere, plazma zarına geri dönerler.

Polarize hücrelerde (örn; epitel hücreleri) içeri alınan reseptörler aynı zamanda, **transsitoz** denilen bir olayla hücreyi kat ederek plazma zarının karşı tarafına taşınabilirler. Örneğin, plazma zarının bazolateral kısmından endositozla alınan bir reseptör, erken endozomların içerisinde, apikal zara aktarılmak üzere ayrılır. Bazı hücrelerde bu, zar proteinlerinin düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır (Şekil 12.44). *trans* Golgi ağında apikal ve bazolateral bölgelere taşınmak üzere ayrımlanmak yerine, proteinler başlangıçta bazolateral bölgeye aktarılırlar (bkz. Şekil 9.29). Daha sonra apikal zara hedeflenen proteinler, bu bölgeye transsitoz yoluyla aktarılırlar. Transsitoz ayrıca,

Şekil 12.43 Sinaptik veziküllerin geri dönüşümü





Şekil 12.44 Transsitoz ile proteinlerin dağıtımı
Plazma zarının apikal kısmına yerleşmesi gereken bir protein, önce, Golgi aygıtından bazolateral bölgeye aktarılır. Daha sonra endositozla alınır ve erken endozomlardan apikal bölgeye özel olarak taşınır.

hücre dışı makromoleküllerin epitel hücre tabakasından geçmelerini sağlayan bir mekanizmadır. Örneğin, epitel hücrelerin bir çok tipi antikorları, kandan, süt gibi çeşitli salgı sıvılarına aktarır. Antikorlar bazolateral yüzeydeki reseptörlere bağlandıktan sonra reseptörleriyle birlikte transsitozla apikal yüzeye alınırlar. Daha sonra reseptörler ayrılır ve antikorlar hücre dışı salgısına karışır.

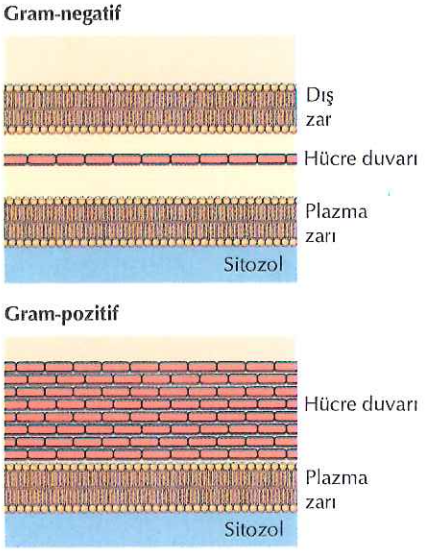
Hücre Duvarları ve Hücre Dışı Matris

Hücre sınırlarının plazma zarıyla belirlenmesine karşın bir çok hücre, salgılanan makro moleküllerden oluşan bir çözünmez katmanla kuşatılmıştır. Bakteri, mantar, alg ve yüksek bitkilerin hücreleri, hücreye dahil bir kısım olan, sert bir duvarla çevrilidirler. Her ne kadar hücre duvarlarıyla kaplanmasalar da, dokuları oluşturan hayvan hücreleri proteinlerden ve polisakkaridlerden oluşan bir hücre dışı matrisle yakından ilişkilidir. Hücre dışı matris sadece hücre ve dokulara destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda çok hücreli canlılarda hücre davranışlarının düzenlenmesinde önemli roller oynar.

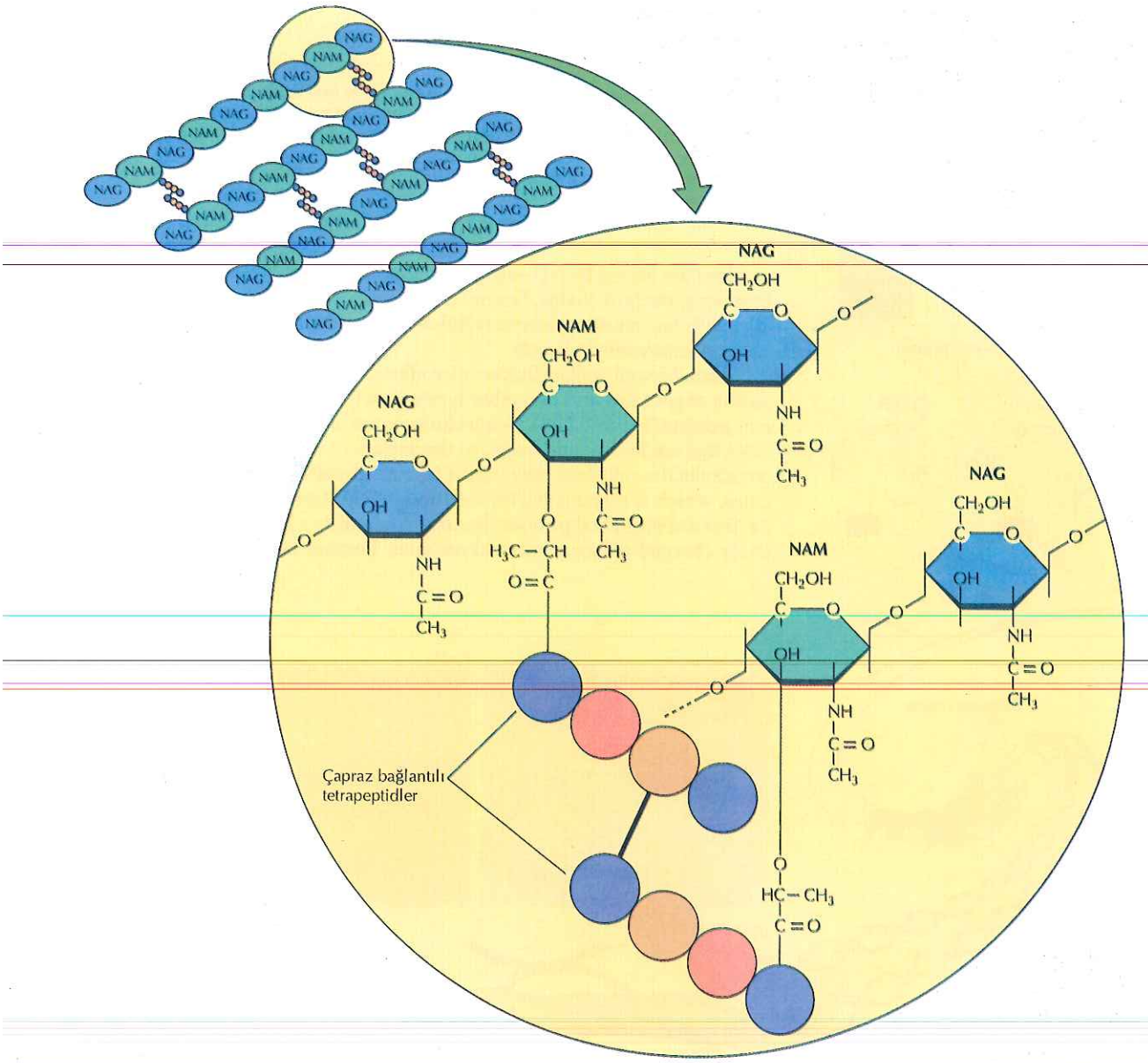
Bakteri Hücre Duvarları

Bakterilerin sert hücre duvarları hücrenin biçimini belirler ve osmotik basınç nedeniyle hücrelerin patlamasını engeller. Bakteriler duvarlarının yapısına göre iki büyük gruba ayrılırlar ki, bunlar, 1884'de Christian Gram tarafından geliştirilmiş olan ve Gram boyası olarak bilinen boyama işlemiyle ayırt edilirler (Şekil 12.45). Bu bölümde daha önce belirtildiği gibi, Gram-negatif bakterilerde (*E.coli* gibi), plazma zarının geçirgen bir dış zarla çevrildiği çift zar sistemine sahiptirler. Bu bakteriler, iç ve dış zarlarının arasına yerleşmiş ince bir hücre duvarına sahiptirler. Buna karşın Gram-pozitif bakteriler (yaygın insan patojeni *Staphylococcus aureus* gibi) çok daha kalın bir hücre duvarıyla çevrilmiş tek bir plazma zarına sahiptirler.

Bu yapısal farklılıklarına karşın Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin her ikisinin de hücre duvarlarındaki ana bileşen, kısa peptidlerle birbirine bağlı doğrusal polisakkarid zincirlerinden oluşan bir **peptidoglikandır** (Şekil 12.46). Çapraz bağlı bu yapı nedeniyle peptidoglikan, tüm bakteri hücresinin çevresinde, güçlü, kovalent bir



Şekil 12.45 Bakteri hücre duvarları
Gram-negatif bakterilerin plazma zarları, dış zarın altında ince bir hücre duvarıyla çevrilidir. Gram-pozitif bakterilerin dış zarları bulunmaz ve kalın hücre duvarına sahiptirler.

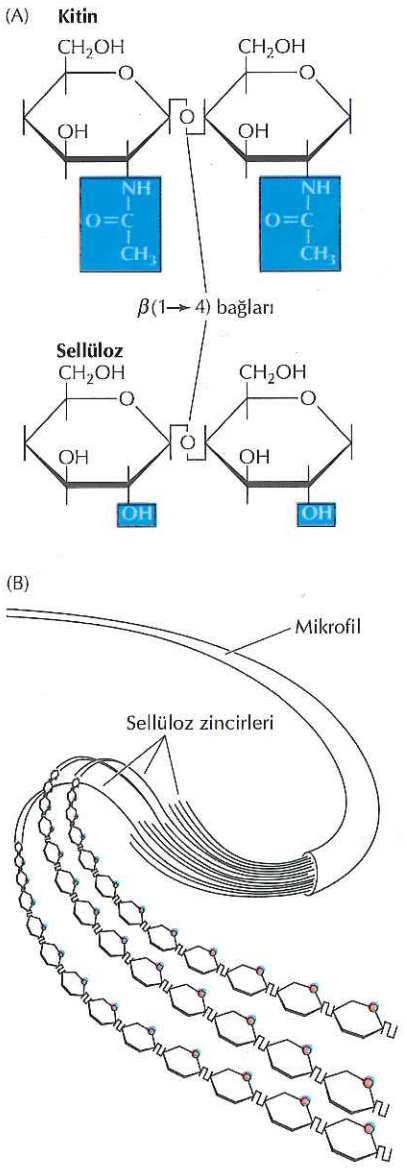


Şekil 12.46 *E.coli* peptidoglikanı
Polisakkarid zincirleri, birbirine β (1→4) glikozidik bağlarıyla bağlanmış, değişimli, N-asetilglukozamin (NAG) ile N-asetilmuramik asit (NAM) monomerlerinden oluşur. Paralel zincirler, NAM monomerlerine tutunan tetrapeptidler ile birbirine bağlanır. Tetrapeptidleri oluşturan amino asitler farklı bakteri suşlarında farklılık gösterir.

kabuk oluşturur. İlginç bir şekilde, hücre duvarlarının farklı yapısı bakterileri bazı antibiyotiklere duyarlı kılar. Örneğin penisilin, ayrı peptidoglikan zincirleri arasında çapraz bağlantıları kuran enzimi engelleyerek hücre duvarı yapılanmasını ve bakteri üremesini durdurur.

Bitki Hücre Duvarları

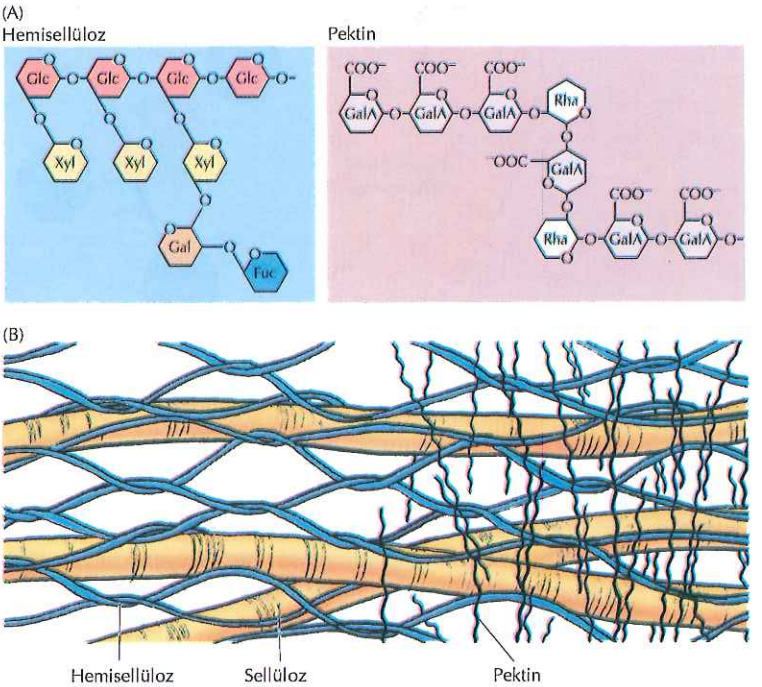
Bakterilerin aksine, ökaryotların hücre duvarları (mantar, alg ve yüksek bitkiler dahil) temel olarak polisakkaridlerden meydana gelmiştir (Şekil 12.47). Mantar hücre duvarlarının temel yapısal polisakkaridi, aynı zamanda artropodların dış iskeletini (yengeç kabukları gibi.,) de oluşturan **kitin** (bir N-asetilglukozamin polimeri) dir. Alglerin çoğunun ve yüksek bitkilerin hücre duvarları temel



Şekil 12.47 Mantar ve bitki hücre duvarı polisakkaridleri
(A) Kitin (mantar hücre duvarlarının temel polisakkaridi) N-asetilglukozamin moleküllerinin doğrusal bir polimeri iken, sellüloz glukozun doğrusal polimeridir. Karbohidrat monomerleri, polisakkaridin uzun ve düz bir zincir oluşturmasına olanak veren, β (1→4) bağlarıyla bağlıdır. (B) Paralel sellüloz zincirleri mikrofibrilleri oluşturmak üzere bir araya gelir.

olarak, yeryüzünde en bol bulunan tek polimer olan **sellülozdan** oluşmuştur. Sellüloz, glukoz moleküllerinden oluşmuş doğrusal bir polimerdir ve genellikle 10,000 den fazla glukoz monomeri içerir. Glukoz molekülleri, polisakkaridin uzun düz zincirler oluşturmasına olanak veren β (1→4) bağlarıyla bağlanır. Bu zincirlerden birkaç düzinesi, paralel düzende bir araya gelerek, mikrometrelerce uzunluktaki **sellüloz mikrofibrillerini** oluştururlar.

Hücre duvarının içinde sellüloz fibrilleri, proteinlerden ve **hemisellüloz** ve **pektin** adı verilen diğer iki polisakkarid türünden oluşan bir matris içerisine gömülürler (Şekil 12.48). Hemisellülozlar, selüloz mikrofibrillerinin yüzeyine hidrojen bağlarıyla bağlanan, yüksek oranda dallanmış polisakkaridlerdir. Sellüloz mikrofibrillerini, bitki hücre duvarının mekanik gücünden sorumlu, güçlü, fibröz moleküller ağı şeklinde birbirine bağlar. Pektinler, çok sayıda, negatif yüklü galakturonik asit molekülü içeren, dallanmış polisakkaridlerdir. Yoğun negatif yük nedeniyle pektinler pozitif yüklü iyonlara (Ca^{2+} gibi) bağlanırlar ve jel oluşturmak üzere su moleküllerini tutarlar.



Şekil 12.48 Bir bitki duvarı modeli
(A) Hemisellüloz (ksiloglikan) ve pektin (ramnogalakturonan) örnek yapıları. Ksiloglukan; ksiloz, galaktoz (Gal) ve fukoz (Fuc) yan dalları bulunan bir glukoz (Glc) omurgasından oluşur. Ramnogalakturonan omurgası, bir çok yan zincirin bağlandığı galakturonik asit (GalA) ve ramnoz (Rha) birimlerinden oluşur. (B) Hemisellüloz sellüloz mikrofibrillerine bağlanarak, jel-benzeri bir pektin matrisi içerisine gömülen ipliksi bir ağ oluşturur.

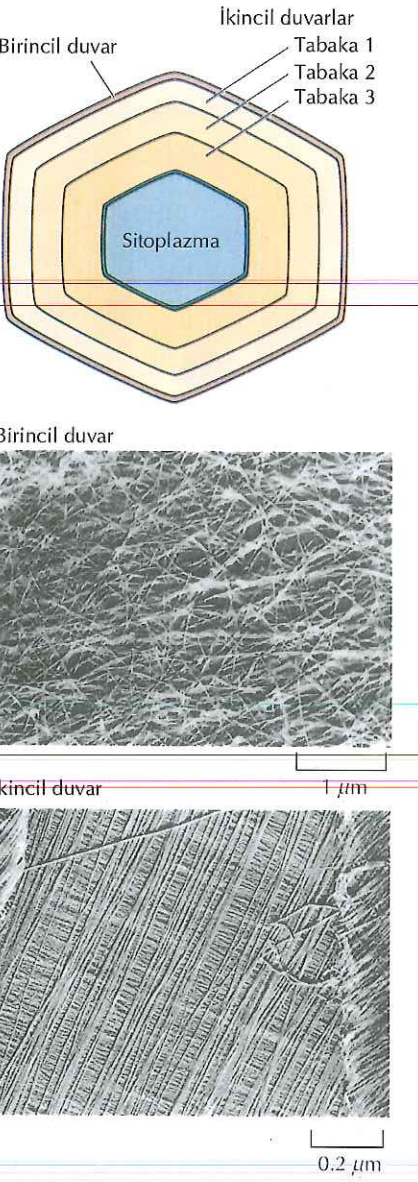
Meyve suyuna pektin eklenerek reçel ve jöle yapımı, jel oluşturma özelliklerine bir örnektir. Hücre duvarında pektinler, birbirine bağlanmış sellüloz mikrofibrilleri ile birbirine bağlanan jel-benzeri bir ağ oluştururlar. Hücre duvarları ayrıca, matris içerisine katılan ve yapısal desteği artıran çeşitli glikoproteinler de içerir.

Bitki hücreleri geliştikçe, hücre duvarlarının hem yapısı hem de işlevi değişir. Büyümekte olan bir bitki hücrelerinin duvarları (**birincil hücre duvarları** olarak adlandırılır), hücrenin büyümesine olanak verecek şekilde, nispeten ince ve esnektir. Hücrelerin büyümesi durunca, genellikle, plazma zarı ile birincil hücre duvarı arasına **ikincil hücre duvarlarını** döşerler (Şekil 12.49). Birincil hücre duvarlarından hem daha kalın hem de daha sert olan bu, ikincil hücre duvarları özellikle, suyu iletmek ve bitkiye mekanik güç sağlamakla görevli hücreler için özellikle önemlidir.

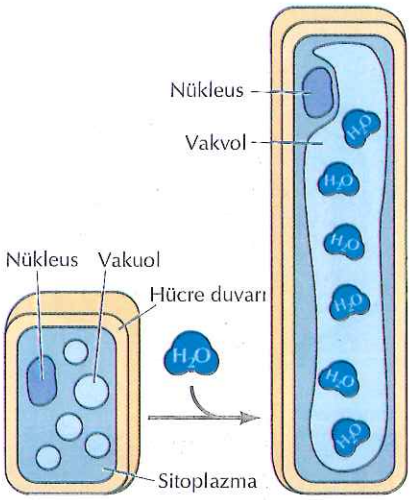
Birincil ve ikincil hücre duvarları, kalınlıkları ve bileşimleri bakımından farklıdır. Birincil hücre duvarları, yaklaşık olarak eşit miktarlarda sellüloz, hemisellüloz ve pektin içerir. Buna karşın daha sert olan ikincil hücre duvarları genellikle pektinden yoksundur ve %50 ila 80 sellüloz içerir. Bir çok ikincil hücre duvarı, fenol birimlerinin bir kompleks polimeri olan **lignin** ile daha da güçlendirilmiştir ki bu, odunun sağlamlığından ve yoğunluğundan büyük ölçüde sorumludur. Birincil ve ikincil hücre duvarlarında sellüloz mikrofibrillerinin dizilimi de farklıdır. Birincil hücre duvarlarındaki sellüloz iplikler gelişigüzel düzenlenirken, ikincil duvarlardakiler son derece düzenlidir (bkz. Şekil 12.49). İkincil hücre duvarları genellikle, sellüloz ipliklerinin farklı yönlerde düzenlenmiş olduğu tabakalar oluşturur ve böylece, hücre duvarının gücünü büyük ölçüde artıran ince tabakalı bir yapı meydana gelir.

Bitki hücre duvarlarının en önemli görevlerinden biri, ozmotik basınç nedeniyle hücrelerin şişmesini engellemektir. Hayvan hücrelerinin aksine bitki hücreleri, sitozolleri ile hücre dışı sıvıları arasında ozmotik dengeyi sürdürmezler. Sonuç olarak ozmotik basınç, hücre içine sürekli su akışını zorlar. Sert hücre duvarlarının, şişme ve patlamayı engellemesi sayesinde bitki hücreleri bu su akışına dayanırlar. Hücre içi hidrostatik basınç (**turgor basıncı denir**) gelişerek sonunda ozmotik basıncı dengeler ve içeri daha fazla su akışını durdurur.

Susuz kalmış ve solmuş bitkilerin incelenmesiyle açıkça görüleceği gibi, turgor basıncı bitki hücresinin diriliğinin başlıca sorumlusudur. Turgor basıncı ayrıca, bitkilere özgü bir hücre büyüme şeklinin de temelini oluşturur. Özellikle, bitki hücresi, yeni sitoplazmik bileşikler sentezlemeden, su alarak genişler (Şekil 12.50). Bu mekanizmayla genleşme, hücre duvarının bir bölgesini zayıflatarak turgor basıncının hücreyi bu yönde genişletmesine olanak sağlayan bitki hormonları (**oksinler**) tarafından uyarılır. Bu gerçekleştiğinde, hücre içerisine akan su büyük bir merkezi vakuolde birikir ve böylece hücre, sitozol hacmini artırmadan genişler. Bu genleşmeler, gelişme sürecinde, bitki hücrelerinin büyüklüğünde 10- ila 100- kat artışa neden olur. Bitki hücrelerinin hücre duvarlarını nasıl değiştirdikleri henüz anlaşılmaya başlamıştır, ancak, hücre duvarındaki pektin polisakkaridleri ya da özel proteinlerle ilişki kurduğu düşünülen ve duvarla-ilişkili kinazlar denilen transmembran protein kinazlarla ilgili olabilir.



Şekil 12.49 Birincil ve ikincil hücre duvarları
İkincil hücre duvarları, birincil hücre duvarı ile plazma zarı arasına yerleşir. İkincil hücre duvarları genellikle, sellüloz mikrofibrillerinin düzeniyle farklılaşan üç tabakadan oluşur. Elektron mikroskop görüntüleri birincil ve ikincil hücre duvarlarındaki selüloz mikrofibrillerini göstermekte. (Birincil hücre duvarı, F.C. Steward'ın nazik katkısı, ikincil hücre duvarı, Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc'den)



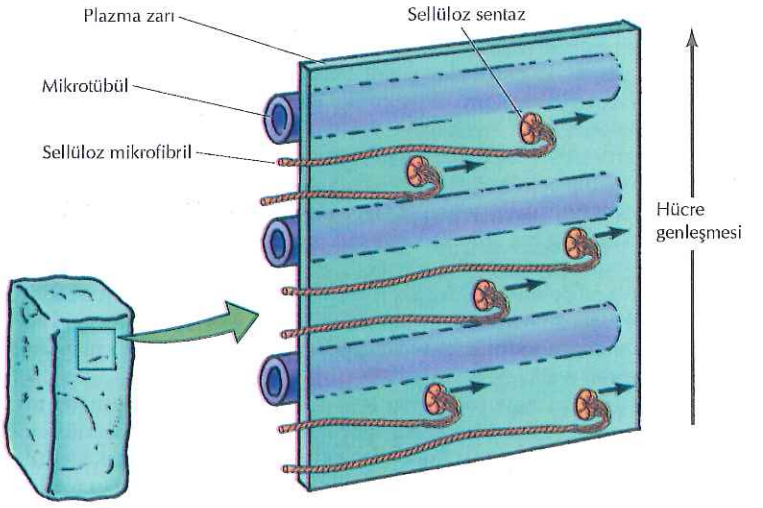
Şekil 12.50 Bitki hücrelerinin genişlemesi
Turgor basıncı, büyük merkezi vakuolde biriken suyun içeri alınmasını sağlayarak bitki hücresinin genişlemesine yol açar.

Hücreler genişledikçe, yeni hücre duvarı bileşenleri plazma zarının dışında biriktirilir. Hemisellüloz ve pektinleri de içeren matris bileşenleri Golgi aygıtında sentezlenerek salgılanır. Sellüloz ise, bir plazma zarı enzim kompleksi (**sellüloz sentaz**) tarafından sentezlenir. Genleşen hücrelerde yeni sentezlenmiş sellüloz mikrofibrilleri, hücrenin uzadığı yöne dik olarak toplanır ki bunun, daha sonraki hücre genleşme yönünün belirlenmesinde önemli rol oynayan bir düzenlenme olduğu düşünülmektedir (Şekil 12.51). Uzayan hücrelerin duvarındaki sellüloz mikrofibrilleri, ilginç şekilde, plazma zarının altını kaplayan kortikal mikrotübüllere paralel olarak yerleşir. Bu mikrotübüller, sellüloz sentaz komplekslerinin zarda hareket yönünü belirlemek suretiyle, yeni sentezlenmiş sellüloz mikrofibrillerinin düzenini tanımladıkları izlenimi vermektedirler. Kortikal mikrotübüller, böylece, hücre duvarının büyüme yönünü belirtir ki bu da, daha sonra hücre genişleme yönünü ve nihayet bitkinin şeklini belirler.

Yapraklar, gövde, kökler ve çiçekler gibi farklı bitki dokularındaki hücre duvarları esas olarak sellülozdan oluşur, fakat matris bileşenleri ve olasılıkla, sellüloz ipliklerinin düzeni yönlerinden farklıdırlar. Olasılıkla, farklı dokulardaki hücre duvarlarının değişik düzenlerinden sorumlu olan, en az, 10 farklı sellüloz sentaz enzimi ve her plazma zarı enzim kompleksinin de iki farklı formu bulunmaktadır.

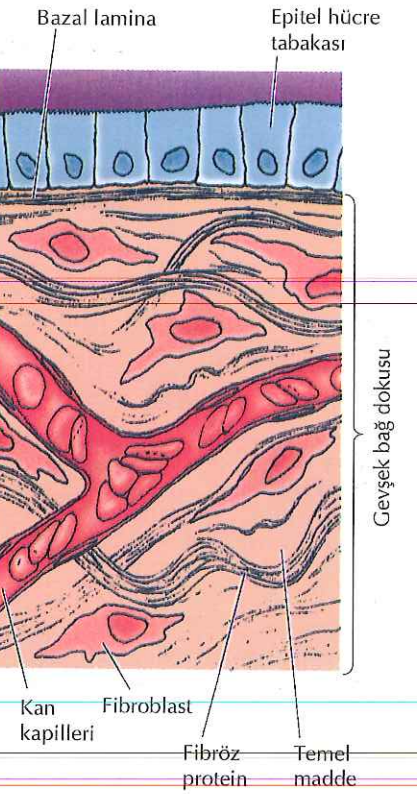
Hücre Dışı Matris

Hayvan hücreleri hücre duvarlarıyla çevrili olmamalarına karşın, çok hücreli canlıların dokularındaki hücrelerin bir çoğu, salgılanan proteinlerden ve polisakkaridlerden oluşan bir **hücre dışı matris** içerisine gömülmüştür. Hücre dışı matris hücreler arasındaki boşlukları doldurur ve hücreleri ve dokuları birbirine bağlar. Üzerine epitel hücre tabakalarının yerleştiği, önceleri taban zarlar olarak adlandırılan, ince, levhamsı **bazal lamina** bir hücre dışı matris tipi örneğidir (Şekil 12.52). Epitel hücre tabakalarına destek olmasının yanı sıra, bazal lamina kas hücrelerini, adipoz hücrelerini ve periferal sinirleri çevreler. Ancak, hücre dışı matris, en fazla, bağ dokularında bulunur. Örneğin, epitel hücre tabakaları altında bulunan gevşek bağ dokusu esas olarak, içerisinde fibroblastların dağınık olarak bulunduğu



Şekil 12.51 Hücre uzaması sürecinde sellüloz sentezi
Plazma zarındaki bir enzim kompleksi (sellüloz sentaz) tarafından sentezlenen yeni sellüloz mikrofibrilleri, hücre uzama yönüne dik açıyla yerleşirler. Sellüloz sentez yönü plazma zarının altındaki mikrotübüllere paraleldir.

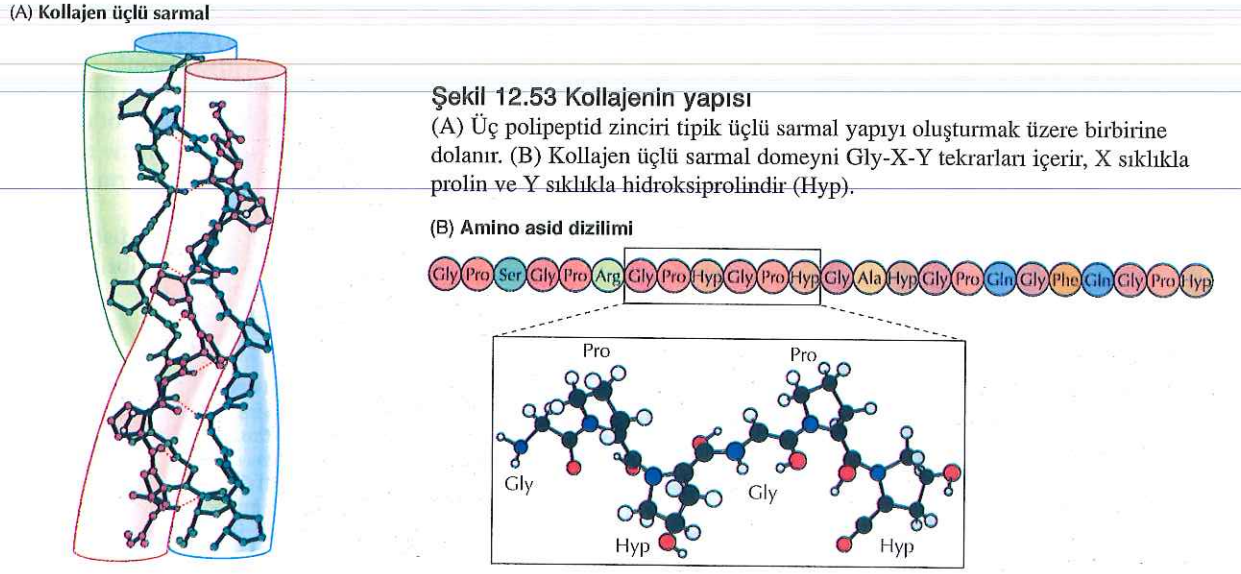
Şekil 12.52 Hücre dışı matris örnekleri
Epitel hücre tabakaları, bazal lamina denilen ince bir hücre dışı matris üzerine yerleşirler. Bazal laminanın altında, büyük kısmı fibroblastların salgıladığı hücre dışı matristen oluşan, gevşek bağ dokusu bulunur. Hücre dışı matris, jel-benzeri polisakkarid temel maddesi içerisine gömülmüş, ipliksi, yapısal proteinler içerir.



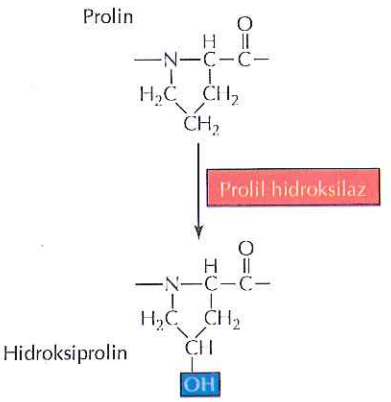
bir hücre dışı matristen ibarettir. Kemik, tendon ve kıkırdak gibi diğer bağ dokusu tiplerinin büyük bölümü de benzer şekilde, yapı ve işlevlerinde öncelikli sorumluluğu olan hücre dışı matristen oluşur.

Hücre dışı matrisler, temel olarak bitki hücre duvarlarındaki desene benzer şekilde, jel-benzeri polisakkarid temel maddesi içerisine gömülmüş, güçlü ipliksi proteinlerden meydana gelmiştir. Hücre dışı matris, ipliksi, yapısal proteinler ve polisakkaridlere ek olarak, matris bileşenlerini birbirine ya da bitişik hücreye bağlayan adezyon proteinleri içerir. Değişik hücre dışı matris tipleri arasındaki farklılık bu genel temadaki değişikliklerden kaynaklanır. Örneğin; kıkırdakta, baskıya-dirençli katı bir jel oluşturan polisakkaridlerden yüksek konsantrasyonda bulunurken, tendonlar yüksek oranlarda ipliksi proteinlere sahiptir. Kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesi nedeniyle, kemikte hücre dışı matris serttir. Bazal laminanın tabaka şeklinde yapılanma nedeni de, bağ dokusundakinden farklı matris bileşimine sahip olmasıdır.

Hücre dışı matrisin en önemli yapısal proteini, hayvan dokularında en bol bulunan tek protein olan **kollajendir**. Kollajenler, en az 19 farklı üyesi bulunan büyük bir protein ailesidir. Üç polipeptid zincirinin, halata benzer bir yapı oluşturmak üzere birbirlerine sıkıca dolandığı üçlü sarmal yapılarıyla karakterizedirler (Şekil 12.53). Kollajenlerin üçlü sarmal bölgelerinde Gly-X-Y amino asit dizisi tekrarları bulunur. Polipeptid zincirlerinin, kollajen üçlü sarmalı oluşturmak üzere, yeterince yakın paketlenebilmesi için her üç amino asitte bir glisin (sadece hidrojenden ibaret bir yan dalı bulunan, en küçük amino asit) bulunması gerekir. X pozisyonunda sıklıkla prolin ve Y pozisyonunda da hidroksiprolin yer alır; halka yapıları nedeniyle bu amino asitler polipeptid zincirlerinin sarmal düzenini sağlamlaştırırlar.



Şekil 12.53 Kollajenin yapısı
(A) Üç polipeptid zinciri tipik üçlü sarmal yapıyı oluşturmak üzere birbirine dolanır. (B) Kollajen üçlü sarmal domeyni Gly-X-Y tekrarları içerir, X sıklıkla prolin ve Y sıklıkla hidroksiprolindir (Hyp).



Şekil 12.54 Hidroksiprolin oluşumu
Prolil hidroksilaz kollajendeki prolinleri hidroksiproline dönüştürür.

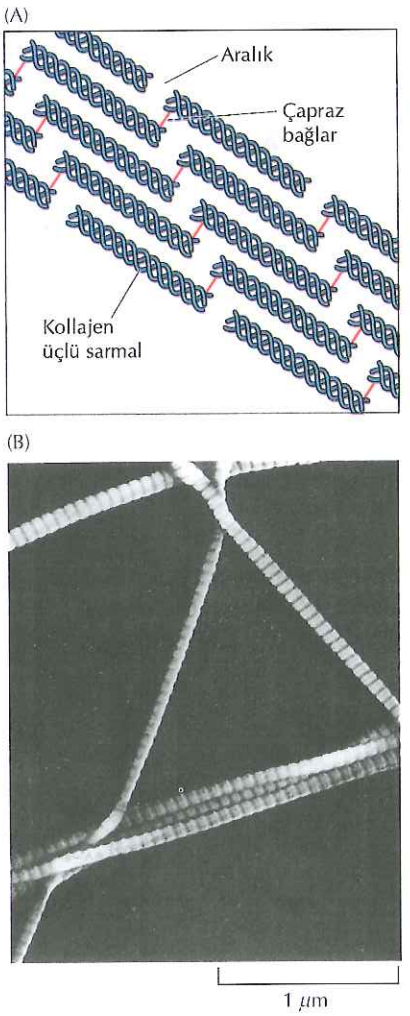
TABLO 12.2 Kollajen Ailesi Üye Örnekleri

Kollajen sınıfı	Tipleri	Doku Dağılımı
Fibril oluşturan	I	Çoğu bağ dokusu
	II	Kartilaj ve vitröz sıvı
	III	Esnek bağ doku (Örn: deri ve akciğerler)
	V	Kollajen I içeren dokular
	XI	Kollajen II içeren dokular
Fibril bağlantılı	IX	Kollajen II içeren dokular
	XII	Kollajen I içeren dokular
	XIV	Kollajen I içeren dokular
	XVI	Çoğu doku
Ağ oluşturan	IV	Bazal lamina
Sabitlenen filamanlar	VII	Bazal laminanın altındaki bağ dokusuna tutunması

Ender görülen hidroksiprolin amino asiti, önceden kollajen polipeptid zincirinin yapısına girmiş olan prolinlerin endoplazmik retikulumda modifikasyonu ile oluşturulur (Şekil 12.54). Kollajende bulunan lizin amino asitleri de genellikle hidroksilizine çevrilir. Bu değiştirilmiş amino asitlerin hidroksil gruplarının, polipeptid zincirleri arasında hidrojen bağı oluşturarak, üçlü sarmalın dayanıklılığını artırdıkları düşünülmektedir. Hidroksiprolinin bitki duvarındaki bazı glikoproteinlerin yapısında da sıklıkla görülmesine karşın, bu amino asitler diğer proteinlerde nadiren bulunur.

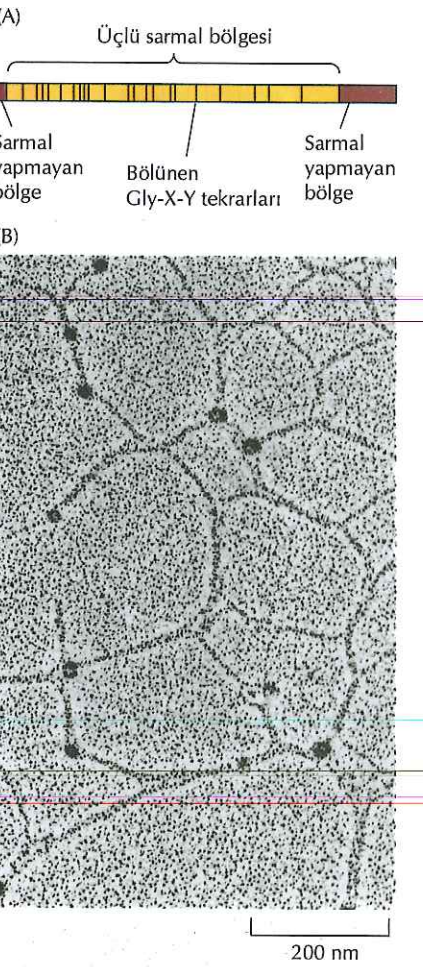
En bol bulunan kollajen tipi (tipI kollajen), bağ dokularının temel yapısal bileşeni olan fibril oluşturan kollajenlerden biridir (Tablo12.2). Bu kollajenlerin polipeptid zincirleri, yaklaşık olarak bin amino asit ya da 330 Gly-X-Y tekrarı kapsar. Bu kollajenler, hücreden salgılandıktan sonra, üçlü sarmal moleküllerin düzenli, aralıklı diziler halinde bir araya geldiği, **kollajen fibrillerini** oluştururlar (Şekil 12.55). Hücre içerisinde bu fibriller oluşmaz çünkü, fibril oluşturacak olan kollajenler, polipeptid zincirinin her iki ucunda sarmal yapmayan kısımları bulunan, çözünür öncü moleküller (**prokollajen**) halinde sentezlenirler. Prokollajen salgılandıktan sonra kollajen oluşturmak üzere kesilir, bu nedenle, kollajenin fibriller halinde birleşmesi sadece hücre dışında gerçekleşir. Kollajen moleküllerinin oluşturduğu fibriller, lizin ve hidroksilizin moleküllerinin yan zincirleri arasında kovalent çapraz- bağlantıların oluşmasıyla daha da güçlenir. Sıklıkla, fibriller bir araya gelerek, çapları birkaç mikrometreye ulaşabilen kollajen lifleri oluştururlar.

Diğer birkaç tip kollajen, fibriller oluşturmaz fakat çeşitli hücre dışı matris türlerinde belirgin role sahiptirler. Bağ dokuları, fibril-oluşturan kollajenlere ek olarak, kollajen fibrillerin yüzeyine bağlanarak onları birbirine veya diğer matris bileşenlerine tutturan, fibril-bağlantılı kollajenler içerirler. Bazal lamina, ağ-yapan kollajen



Şekil 12.55 Kollajen fibriller
(A) Kollajen molekülleri fibrilleri oluşturmak üzere, düzenli yalpalayan bir dizilimde bir araya gelir. Moleküller boylarının dörtte biri ile çakışırlar ve bir molekülün N ucu ile diğerinin C ucu arasında kısa bir aralık bulunur. Bu topluluk, özellikle, moleküllerin ucundaki lizin ve hidroksilizin yan zincirleri arasındaki kovalent çapraz-bağlar ile güçlendirilir. (B) Kollajen fibrillere ait elektron mikroskop görüntüsü. Kollajen moleküllerinin yalpalar düzeni ve aralarındaki açıklık, fibrilerdeki tipik çapraz-çizgilerin nedenidir. (B, J. Gross, F. O. Sahmitt ve D.Fawcett/Visuals Unlimited.)

Şekil 12.56 Tip IV kollajen
(A) Tip IV kollajendeki Gly-X-Y tekrar dizileri (sarı) çok sayıda, sarmal yapmayan dizilerle (çizgiler) bölünür. (B) Bir Tip IV kollajen ağının elektron mikroskop görüntüsü. (B, P.D. Yurchenco ve J.C. Schittny, 1990. FASEB J, 4: 1577.)

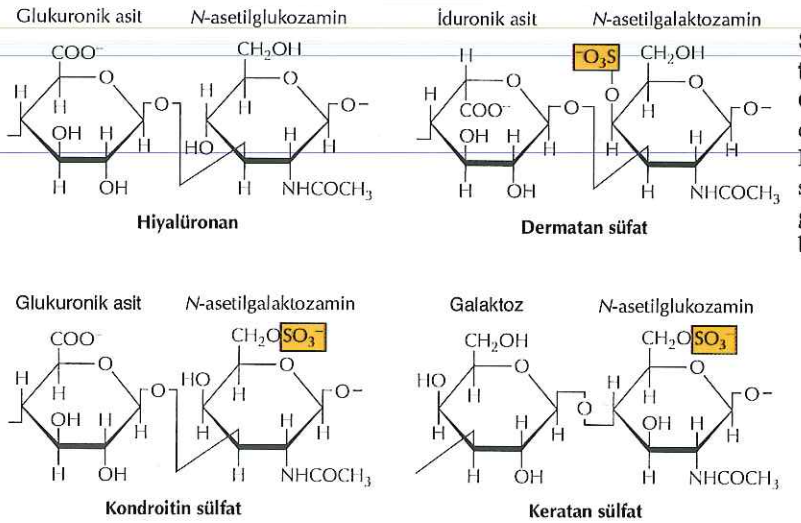


denilen farklı bir kollajen tipinden (Tip IV kollajen) oluşmuştur (Şekil 12.56). Bu kollajenlerdeki Gly-X-Y tekrarları genellikle, kısa, sarmal yapmayan dizilerle bölünmüştür. Bu kesintiler nedeniyle, ağ-yapan kollajenler fibril-yapan kollajenlere kıyasla daha esnektir. Sonuç olarak, fibril yerine, iki boyutlu ve çapraz bağlantılı bir ağ halinde bir araya gelirler. Bir başka kollajen tipi de, bazı bazal laminaları alttaki bağ tabakasına bağlayan sabitleme fibrillerini oluşturur.

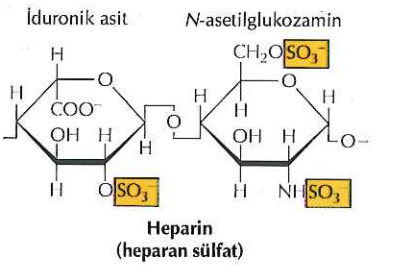
Bağ dokuları, düzenli olarak genleşip tekrar başlangıçtaki biçimine dönen organlarda özellikle bol miktarda bulunan **elastik liflere** de sahiptir. Örneğin; akciğerler her nefes alışta genişler ve her nefes verişte başlangıç şekline geri dönerler. Elastin lifler esas olarak, lizin moleküllerinin yan zincirleri arasında oluşan kovalent bağlarla (kollajendekine benzer) çapraz bağlantılı bir ağ oluşturan elastin proteininden meydana gelmiştir. Çapraz bağlı elastin zincirleri ağı, gerildiğinde genişleyen, bırakılınca eski haline dönen bir lastik bant gibi davranır.

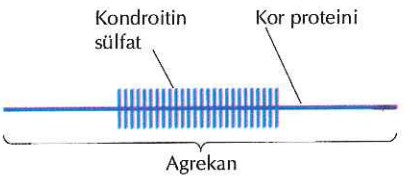
Hücre dışı matrisin ipliksi yapılı proteinleri, tekrarlayan disakkarid birimlerinden meydana gelen ve **glikozaminoglikanlar** ya da **GAGlar** denilen polisakkaridlerden oluşan jeller içerisine gömülmüştür (Şekil 12.57). Disakkaridin şekerlerinden biri ya N-asetilglukozamin ya da N-asetilgalaktozamindir ve ikincisi genellikle asidiktir (glukronik asit veya iduronik asit). Hiyalüronan hariç bu şekerler, sülfat grubu eklenerek modifiye edilmişlerdir. Bu nedenle GAG'lar yüksek oranda negatif yüklüdür. Bitki hücre duvarlarındaki pektin gibi, pozitif yüklü iyonları bağlayarak su moleküllerini tutar ve sulu jel oluştururlar, böylece hücre dışı matrise mekanik destek sağlarlar.

Hiyalüronan, tek bir uzun polisakkarid zinciri halinde bulun yegane GAG'dır. Tüm diğer GAG'lar, ağırlıklarının %95'ine kadar polisakkarit bulundurabilen **proteoglikanları** oluşturmak üzere,

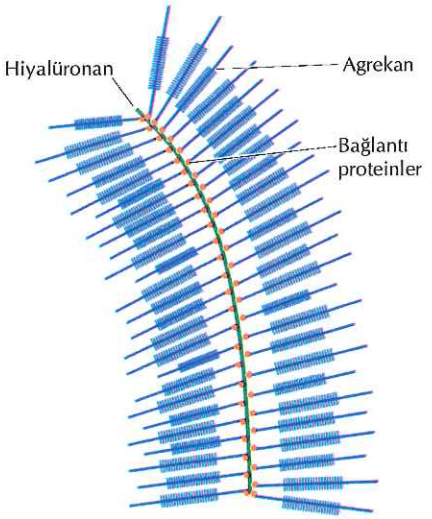


Şekil 12.57 Majör glikozaminoglikan tipleri
Glikozaminoglikanlar tekrarlayan disakkarid birimlerinden oluşurlar. Hiyaluronan dışındaki şekerler genellikle sülfat içerir. Heparan sülfat, daha az sülfat grubuna sahip olması dışında, heparine benzer.





Şekil 12.58 Agrekan ve hiyalüronan kompleksleri
Agrekan, bir kor proteine bağlanmış yüzden fazla kondroitin sülfat zincirinden oluşan büyük bir proteoglikandır. Kıkırdağın hücre dışı matrisinde, çok sayıda agrekan molekülü uzun hiyalüronan zincirlerine bağlanarak büyük kompleksler oluştururlar. Bu birleşim, bağlantı proteinleriyle sabitlenir.

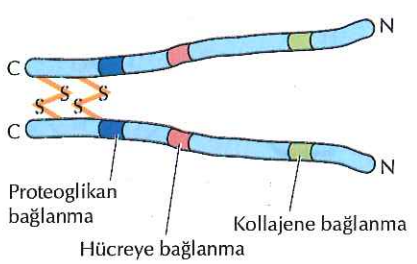


proteinlere bağlanırlar. Proteoglikanlar, bir kor proteinin serin birimlerine tutunmuş, en az bir ve en çok yüzden fazla GAG zinciri içerebilir. Çeşitli kor proteinlerinin (10 ila >500 kd aralığında) tanımlanmış olması, proteoglikanların çeşitlenmiş bir makromolekül grubu olduğunu belirtir. Hücre dışı matris bileşeni olmalarının yanı sıra, bazı proteoglikanlar, hücre yapışmasında (adezyon) işlev gören hücre yüzey proteinleridir. Bu proteoglikanlardan bazıları, sindekanlar, transmembran domeyne sahiptirler ve adezyon komplekslerinden sinyal iletiminde integrinlerle birlikte yer alırlar.

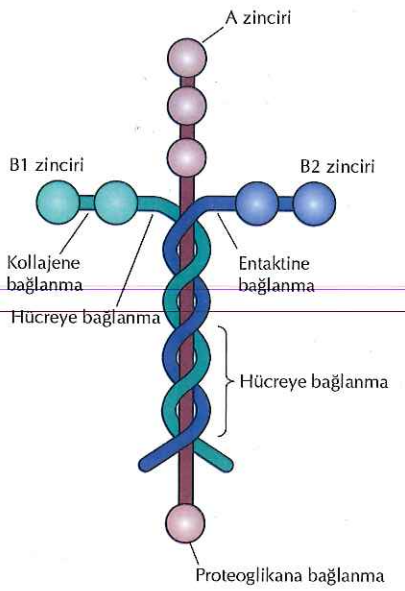
Bir miktar proteoglikan, hücre dışı matriste büyük kompleksler oluşturmak üzere hiyalüronan ile ilişkiye girer. İyi tanımlanmış bir örnek, kıkırdağın majör proteoglikanı olan agrekandır (Şekil 12.58). Yüzden fazla kondroitin sülfat zinciri, 250 kd civarında bir kor proteinine tutunarak, yaklaşık 3000 kd büyüklükte bir proteoglikan oluşturur. Çok sayıda agrekan molekülü daha sonra hiyalüronan zincirleriyle bağlanarak, kollajen ağı içerisine hapsedilen büyük kümeler (>100,000 kd) oluştururlar. Proteoglikanlar ayrıca, kollajenler ve diğer matris proteinleriyle de etkileşerek, hücre dışı matristeki ipliksi yapısal proteinlerin içine yerleştiği, jelimsi ağlar oluştururlar. Örneğin; perlekan (bazal laminanın en önemli heparan sülfat proteoglikanı), az sonra tartışılacağı gibi, hem tip IV kollajene hem de adezyon proteini laminine bağlanır.

Hücre dışı matris öğelerinden üçüncü grubu oluşturan adezyon molekülleri, matris bileşenlerinin birbirlerine ve hücrelerin yüzeylerine tutunmasından sorumludur. Bu moleküllerin prototipi, bağ dokularının temel adezyon molekülü olan **fibronektin**dir. Fibronektin, her biri 2500 kadar amino asit içeren iki polipeptid zincirinden oluşan bir dimerik glikoproteindir (Şekil 12.59). Hücre dışı matrisde fibronektin disülfid bağlarıyla çapraz bağlanarak fibrilleri oluşturur. Fibronektin, hem kollajen hem de GAG'lara özgül bağlanma bölgelerine sahip olduğundan, bu matris bileşenlerini birbirine bağlar. Fibronektin molekülü üzerindeki belirgin bir alan hücre yüzey reseptörleri tarafından tanınır, bu nedenle, hücrelerin hücre dışı matrise tutunmasıyla yükümlüdür.

Bazal lamina, **laminin** ailesinden, farklı adezyon molekülleri içerir (Şekil 12.60). Lamininler, tip IV kollajene benzer şekilde, birbirine dolanmış polimerler şeklinde bir araya gelirler. Bu gibi laminin ağları, çok erken embriyolarda sentezlenen ve kollajen içermeyen bazal laminaların ana yapısal bileşenleridir. Lamininler; hücre yüzey



Şekil 12.59 Fibronektin yapısı
Fibronektin, benzer polipeptid zincirlerinin C uçlarına yakın bir bölgeden disülfid bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan bir dimerdir. Proteoglikanlara, hücrelere ve kollajene bağlanma bölgeleri belirtilmiştir. Molekül, burada gösterilmeyen ek bağlanma bölgelerine de sahiptir.

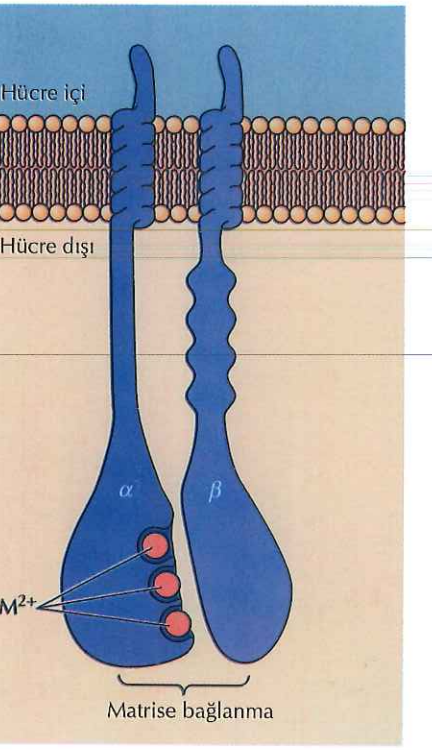


Şekil 12.60 Lamininlerin yapısı
Lamininler, A, B1 ve B2 olarak belirtilen üç polipeptid zincirinden oluşur. Entaktin, tip IV kollajen, proteoglikanlar ve hücre yüzey reseptörleri için bazı bağlanma bölgeleri görülmekte.

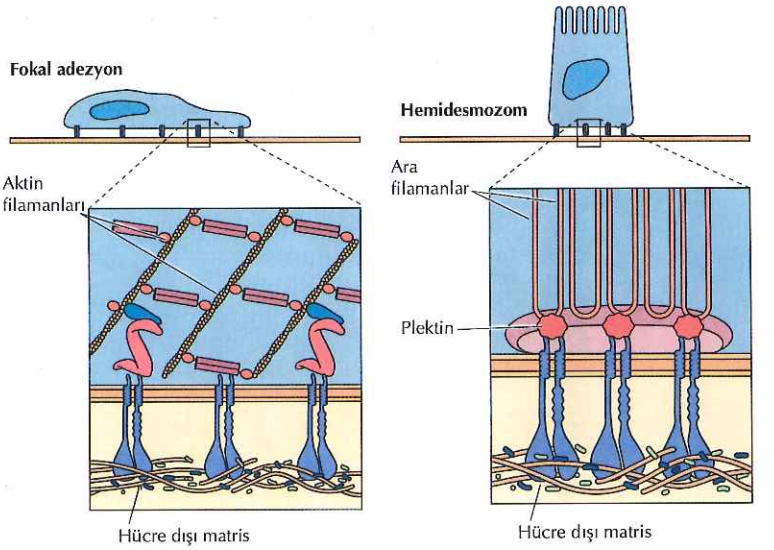
reseptörleri, tip IV kollajen ve perlekan için de bağlanma bölgelerine sahiptir. Lamininler, ayrıca, yine tip IV kollajene bağlanan, **entaktin** ve **nidojen** olarak adlandırılan diğer adezyon proteinleriyle de sıkı bağlantılıdır. Bu çoklu etkileşimlerin sonucu olarak, laminin, entaktin, tip IV kollajen ve perlekan bazal laminada çapraz bağlantılı ağlar oluştururlar.

Hücrelerin, hücre dışı matrise tutunmalarından sorumlu başlıca hücre yüzey reseptörleri **integrinler**dir. İntegrinler, α ve β ile simgelenen iki alt birimden oluşan, transmembran proteinler ailesidir (Şekil 12.61). Bilinen 18 α ve 8 β alt biriminin kombinasyonlarından oluşan, 20'den fazla, farklı integrin tanımlanmıştır. İntegrinler, kollajen, fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matrisin bir çok bileşeninde bulunan, kısa amino asit dizilerine bağlanırlar. İlk olarak tanımlanan integrin- bağlanma dizisi, integrin ailesinin birkaç üyesi tarafından tanınan Arg-Gly-Asp dizisidir. Bununla birlikte, diğer integrinler, kollajenlerdeki ve lamininindeki tanınma dizileri gibi farklı peptid dizilerine bağlanırlar. Çeşitli hücrelerin yüzeyindeki transmembran proteoglikanlar da, hücre dışı matris bileşenlerine bağlanarak, hücre-matris etkileşimlerini düzenlerler.

Hücreleri hücre dışı matrise bağlamalarının yanı sıra, integrinler, hücre iskeleti için çapa görevi yaparlar (Şekil 12.62). Hücre iskeletinin, bu şekilde hücre dışı matrise bağlanması, hücre-matris bağlantılarının sağlamlığından sorumludur. İntegrinler ile hücre iskeleti arasında belirgin bağlantılar, iki tip hücre-matris bağlantısında, Bölüm 11'de tartışılan **fokal adezyonlar** ve **hemidesmozomlarda** bulunur. Fokal adezyonlar, fibroblastlar gibi çeşitli hücreleri hücre dışı



Şekil 12.61 İntegrinlerin yapısı
İntegrinler, α ve β olarak simgelenen iki transmembran alt birimin heterodimerleridir. Alfa alt birimi iki değerlikli katyonları (M^{2+}) bağlar. Matrise-bağlayan bölge, her iki alt birimin parçasını içerir.



Şekil 12.62 Hücrelerle hücre dışı matris arasındaki bağlantılar
İntegrinler, hücre iskeletini hücre dışı matrise bağlayan iki tip, kararlı bağlantıya aracılık eder. Fokal adezyonlarda aktin filaman demetleri, α- aktinin, talin ve vinkulin gibi (bkz. Şekil 11.14) diğer bazı moleküller aracılığıyla, integrinlerin β alt birimlerine tutunur. Hemidesmozomlarda, $\alpha_6\beta_4$ integrini bazal laminayı, plektin aracılığıyla, ara filamanlara bağlar.

matrise bağlar. Bu hücre-matris bağlantılarındaki integrinlerin β alt birimlerinin sitoplazmik bölümleri, talin ya da vinkulin gibi aktine bağlanan proteinler aracılığıyla aktin filaman demetlerine bağlanarak, hücre aktin iskeletini matrise bağlar. Hemidesmozomlar, özgül bir integrinin ($\alpha_6\beta_4$), plektin aracılığıyla, aktinle değil ara filamanlarla birleştiği, özel, epitel hücreleri bitişme bölgeleridir. $\alpha_6\beta_4$, laminine bağlanır ve böylece, hemidesmozom, epitel hücrelerini bazal laminaya sabitler.

Hücre-Hücre Etkileşimleri

Hücreler arasındaki doğrudan etkileşimler, hücre ile hücre dışı matris arasındakiler gibi, çok hücreli canlıların gelişim ve fonksiyonları için son derece önemlidir. bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki etkileşimler ya da akyuvarları enfeksiyonlu doku bölgesine yönlendiren etkileşimler gibi bazı hücre-hücre etkileşimleri kısa sürelidir. Bunların dışında, kararlı hücre-hücre bağlantıları, hücrelerin doku içinde düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Örneğin; epitel hücre tabakalarının devamlılığı ve işlevleri için, birkaç farklı tip kararlı hücre-hücre bağlantısı büyük önem taşır. Bitki hücreleri de, sadece hücre duvarları arasındaki etkileşimle değil, aynı zamanda plazma zarları arasındaki özel bağlantılarla da birleşirler.

Hücre Adezyon Proteinleri

Hücre-hücre adezyonu seçici bir işlemdir, başka deyişle, hücreler sadece belirli tipteki diğer hücrelere tutunurlar. Bu seçicilik ilk kez, bir dokuya ait hücrelerin (örn; karaciğer) farklı bir dokuya ait hücrelere değil (örn; beyin), özgül olarak, aynı dokunun hücrelerine tutunduğunu gösteren klasik embriyo gelişimi çalışmalarıyla belirlendi. Böyle seçici hücre-hücre adezyonu, **hücre adezyon molekülleri** denilen transmembran proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu moleküller dört büyük gruba ayrılır: **selektinler, integrinler, immünglobulin (Ig) süper ailesi** (immünglobulinlere benzer yapısal bölümlere sahip oldukları için böyle adlandırılıyorlar) ve **kaderinler**

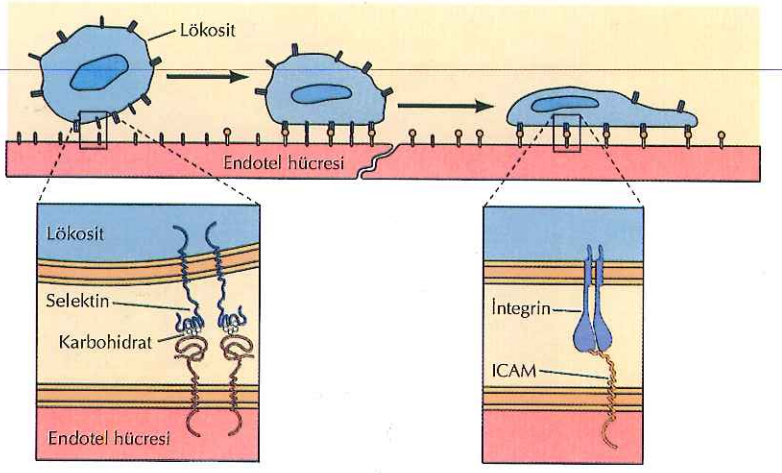
TABLO 12.3 Hücre Adezyon Molekülleri

Aile	Tanıdığı Ligandlar	Kararlı Hücre bağlantısı
Selektinler	Karbohidratlar	Hayır
İntegrinler	Hücre dışı matris Ig süper ailesi elemanları	Fokal adezyonlar ve hemidesmozomlar
Ig süper ailesi	İntegrinler Homofilik bağlantılar	Hayır Hayır
Kaderinler	Homofilik bağlantılar	Aterens bağlantılar ve desmozomlar

(Tablo 12.3). Selektinler, integrinler ve kaderinler aracılıklı hücre adezyonu Ca^{2+} veya Mg^{2+} gerektirdiğinden, hücreler arasındaki yapıştırıcı etkileşimlerin çoğu Ca^{2+} veya Mg^{2+} bağımlıdır.

Selektinler, lökositler ile endotel hücreleri veya kan trombositleri arasında geçici bağlantılara aracılık eder. Selektin ailesinin üç üyesi vardır: Lökositler üzerinde bulunan L-selektin, endotel hücreleri üzerinde bulunan E-selektin ve plateletler üzerinde bulun P-selektin. Bu bölümde daha önce gördüğümüz gibi, selektinler, hücrelerin yüzeyindeki karbohidratları tanır (bkz. Şekil 12.14). En önemli görevlerinden biri, lökositlerin, kandan enfeksiyonlu doku bölgesine göçü sırasında, lökositler ile endotel hücreleri arasındaki etkileşimi başlatmasıdır (Şekil 12.63). Selektinler, lökositlerin endotel hücrelerine ilk yapışmasını sağlar. Bunu, lökositlerin yüzeyindeki integrinlerin, endotel hücrelerinin yüzeyinde sergilenen ve Ig süper ailesi üyeleri olan, hücreler arası adezyon moleküllerine (ICAM'lar) bağlanarak, daha kararlı bir bağlantı oluşturmaları izler. Sıkıca tutunmuş olan lökositler, artık, endotel hücreleri arasından kapiler duvarlarını geçerek alttaki dokuya girebilirler.

ICAM'ların integrinlere bağlanması **heterofilik etkileşimlere** örnektir, çünkü, hücrenin yüzeyindeki bir adezyon molekülü (örn; bir ICAM), diğer hücrenin yüzeyindeki farklı bir molekülü (örn; bir integrin) tanımaktadır. Ig süper ailesinin diğer üyeleri, bir hücrenin yüzeyindeki bir adezyon molekülünün, diğer hücrenin yüzeyinde aynı moleküle bağlanması şeklindeki homofilik etkileşimleri gerçekleştirirler. Bu şekildeki **homofilik etkileşimler,** aynı tipten



Şekil 12.63 Lökositler ile endotel hücreleri arasında bağlantı
Lökositler, doku yangısı olan bölgelerde, kapiler duvarlarındaki endotel hücrelerine tutunarak dolaşımı terk ederler. Bu etkileşimin ilk aşaması, lökosit selektinlerinin, endotel hücrelerinin yüzeyindeki karbohidrat ligandlara bağlanmasıdır. Bu aşamayı, lökosit integrinleri ile, endotel hücrelerinin üzerindeki Ig süper ailesi üyeleri (ICAM lar) arasında gerçekleşen, çok daha kararlı bağlantılar izler.

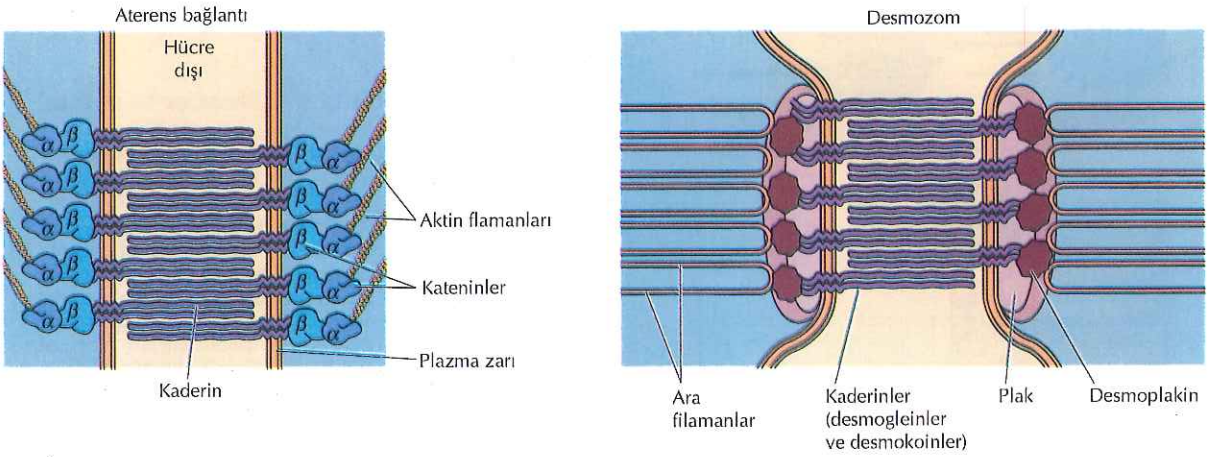
hücreler arasında seçici yapışmayı sağlar. Örneğin, sinir hücresi adezyon molekülleri (N-CAM'lar), sinir hücreleri üzerinde bulunan Ig süper ailesi üyeleridir ve N-CAM'lar arasındaki homofilik bağlanmalar, gelişim sürecinde sinir hücreleri arasında seçici toplulukların oluşmasına katkı sağlar. Çeşitli hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eden 100'den fazla Ig süper ailesi üyesi bulunmaktadır.

Hücre adezyon moleküllerinin dördüncü grubu olan kaderinler de homofilik bağlanma özellikleri gösterirler. Embriyonik hücreler arasındaki seçici yapışmalarda, sinir sisteminde özel sinapsların oluşmasında rol oynayan, dokuları oluşturan hücreler arasında kalıcı bağlantıların oluşumundan sorumlu proteinlerdir. Kaderinler, homofilik etkileşimlerde görev alan ortak bir hücre dışı işlevsel bölümü paylaşan büyük bir protein ailesidir (yaklaşık 80 üye). Hem transmembran hem de sitozolik bölümleri açısından farklı, birkaç, kaderin alt ailesi bulunur (klasik kaderinler, yağ-benzeri kaderinler, yedi transmembran bölgeli kaderinler).

Klasik kaderinler, tek transmembran bölge içerirler ve sitozolik bölümlerinin β- katenin veya desmoplakin ile ilişkilenmesi yoluyla hücre iskeletine bağlanırlar (Şekil 12.64). Sitozoldeki işlevsel kısmın diğer bir bölümü, hücre-hücre temasının oluşumunu ve kalıcılığını denetleyen, küçük, GTP- bağlayan Rho ailesi proteinlerini etkileyen GTP değiştirme faktörlerini bağlar. Örneğin, E-kaderin, epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur ve E-kaderinler arasında homofilik ilişkiler epitel hücrelerin birbirine seçici olarak yapışmasını sağlar. Hücre davranışlarının denetiminde hücre-hücre etkileşimlerinin önemine örnek olarak, E-kaderin kaybının, epitel hücre kökenli kanserlerin gelişimine neden olduğundan söz edebiliriz. Kaderin ailesinden N-kaderin (sinir hücresi kaderini) ve P-kaderin (plasenta kaderini) gibi diğer üyeler de diğer hücre tiplerinin seçici yapışmalarına aracılık ederler.

Önceki bölümde ele alınan kararlı hücre-matris bağlantılarının aksine, selektinler, integrinler ve Ig süper ailesi üyelerinin aracılık ettikleri hücre-hücre bağlantıları, bitişik hücrelerin iskeletlerinin birbirine bağlanmadığı, kısa süreli yapışmalardır. Bitişik hücrelerin

Şekil 12.64 Kaderinlerin aracılık ettiği, kararlı hücre-hücre bağlantıları
Kaderinler arasındaki homofilik etkileşimler, iki tip, kararlı hücre-hücre bağlantısı sağlar. Aterens bağlantılarda, kaderinler, kateninler aracılığıyla aktin filaman demetlerine bağlanırlar (bkz. Şekil 11.15). Desmozomlarda, desmoplakin, kaderin süper ailesi üyelerini (desmogleinler ve desmokolinler) ara filamanlara bağlar (bkz. Şekil 11.36).

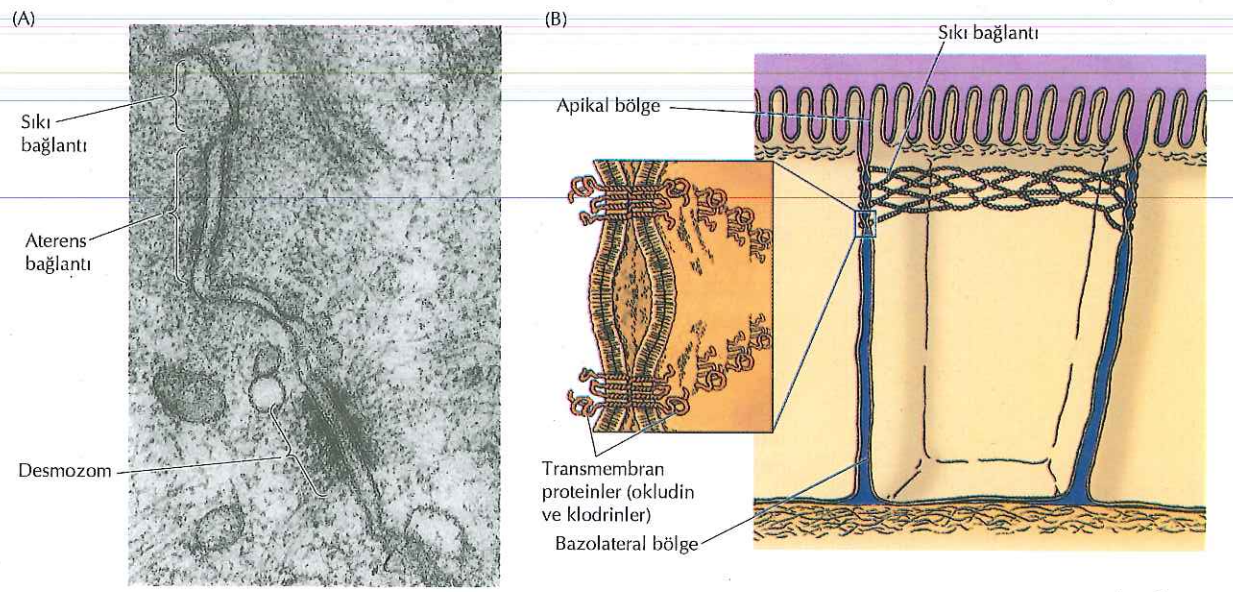


hücre iskeletlerinin dahil olduğu kararlı adezyon bağlantıları ise, kaderinler aracılığıyla gerçekleşir. Bölüm 11'de tartışıldığı gibi, bu hücre-hücre bağlantıları iki tiptir: **aterens bağlantılar** ve **desmozomlar,** ki burada, kaderinler veya ilişkili proteinler (desmogleinler ve desmokolinler), sırasıyla, aktin demetlerine ve ara filamanlara bağlanırlar (bkz. Şekil 12.64). Kaderinlerin, bitişik hücre iskeletlerini ilişkilendirmedeki rolleri, integrinlerin, hücrelerle hücre dışı matris arasında kararlı bağlantılar oluşturmasına benzer.

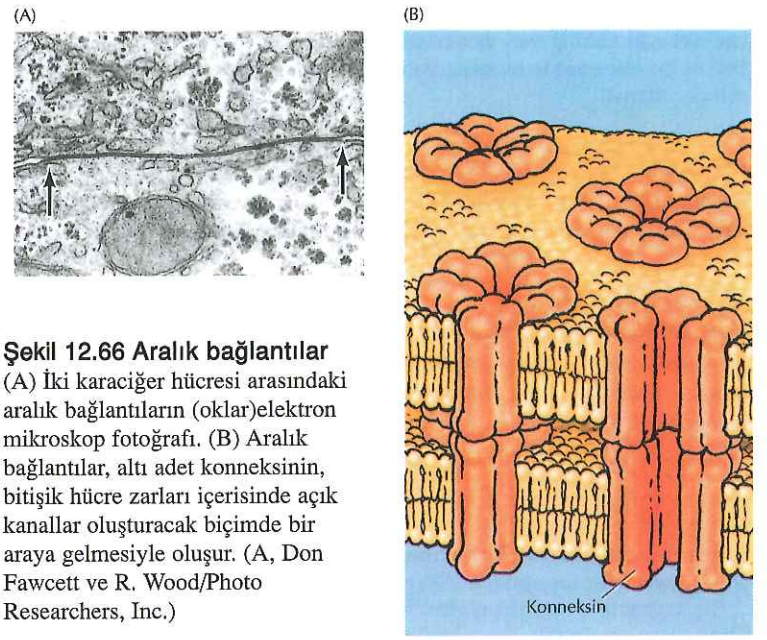
Sıkı Bağlantılar

Hayvan dokularında, kaderinlerin aracılık ettiği yapışma bağlantılarına ek olarak, diğer iki tip özelleşmiş hücre-hücre bağlantısı anahtar rol oynar. Genellikle, aterens bağlantılar ve desmozomlar ile, **bağlantı komplekslerini** oluşturan **sıkı bağlantılar** (Şekil 12.65), epitel hücre tabakalarının sıvı bölmeleri arasındaki engelleyici görevi için son derece önemlidir. Örneğin barsak epiteli, barsak lümenini, kan kapilerleri içeren alttaki bağ dokusundan ayırır. Sıkı bağlantılar, epitellerin bu gibi engelleme işlevlerini yerine getirmesini sağlayan iki rol oynar. İlk olarak, sıkı bağlantılar, epitel tabakasının hücreleri arasından moleküllerin (iyonlar dahil) serbestçe geçmesini engelleyen contalar oluştururlar. İkinci olarak, sıkı bağlantılar, aralarında lipidlerin ve zar proteinlerinin serbest difüzyonunu engelleyerek, plazma zarlarının apikal ve bazolateral bölümlerini ayırır. Böylece, apikal ve bazolateral bölgelerdeki özelleşmiş transport sistemleri, glukozun barsak lümeni ile kan dolaşımı arasında taşınmasında olduğu gibi, farklı hücre dışı bölmeler arasındaki molekül trafiğini denetleyebilirler (bkz. Şekil 12.33).

Sıkı bağlantılar, bitişik hücreler arasında, bilinen en yakın temastır. Başlangıçta, plazma zarlarının dış tabakaları arasında belirgin kaynaşma noktaları olarak tanımlanmış olmalarına karşın, bugün zarlar arasında bir kaynaşma olmadığı açıktır. Aslında, sıkı bağlantıların, hücrenin tüm çevresini dolanan bir protein iplikleri ağından oluştuğu görülür (bkz. Şekil 12.65). Bu ağdaki ipliklerden her



Şekil 12.65 Sıkı bağlantılar
(A) Bir sıkı bağlantıyı, bir aterens bağlantıyı ve bir desmozomu kapsayan bağlantı kompleksi ile birleşmiş epitel hücrelerine ait elektron mikroskop görüntüsü. (B) Sıkı bağlantılar, bitişik hücreler üzerindeki transmembran protein iplikleri (okludinler ve klodinler) arasındaki etkileşimlerle oluşur. (A, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc.)



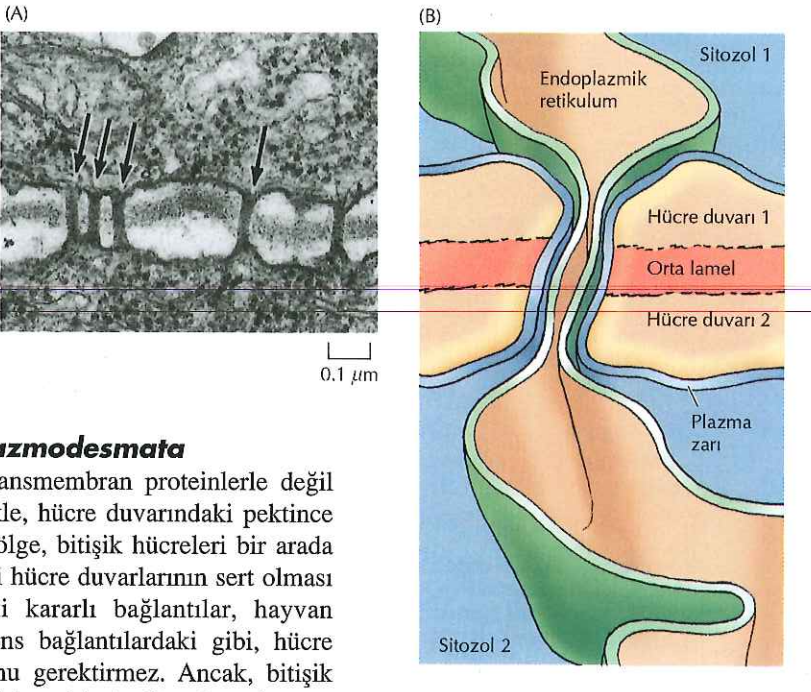
Şekil 12.66 Aralık bağlantılar
(A) İki karaciğer hücresi arasındaki aralık bağlantıların (oklar)elektron mikroskop fotoğrafı. (B) Aralık bağlantılar, altı adet konneksinin, bitişik hücre zarları içerisinde açık kanallar oluşturacak biçimde bir araya gelmesiyle oluşur. (A, Don Fawcett ve R. Wood/Photo Researchers, Inc.)

birinin, bitişik hücrelerdeki benzer proteinleri birbirine bağlayarak plazma zarları arasındaki alanı mühürleyen, transmembran proteinlerden (klodinler ve okludinler) oluştuğu düşünülmektedir.

Aralık (gap) Bağlantılar

Hayvan dokularının çoğunda bulunan **aralık bağlantılar,** bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasındaki doğrudan bağlantılardır. İyonların ve küçük moleküllerin (yaklaşık olarak bin dalton'dan az) komşu hücreler arasında serbestçe geçmesine olanak veren, ancak, proteinlerin ve nükleik asitlerin geçişini engelleyen, plazma zarlarını kat eden, açık kanallar oluştururlar. Sonuç olarak, aralık bağlantılar, birleştirdikleri hücrelerin hem metabolik aktivitelerini hem de elektrik yanıtlarını eşlerler. Epitel hücreleri, endotel hücreleri, kalp kası ve düz kas hücreleri gibi, hayvan dokularındaki hücrelerin çoğu, aralık bağlantılar yoluyla haberleşirler. Kalp kası hücreleri gibi elektrikle uyarılabilen hücrelerde aralık bağlantılardan iyonların doğrudan geçişi, komşu hücrelerin de kasılmasını uyarır ve senkronize eder. Aralık bağlantılar, aynı zamanda, cAMP ve Ca^{2+} gibi bazı hücre içi sinyal iletim moleküllerinin de bitişik hücreler arasında geçişine izin vererek, dokuyu oluşturan hücrelerin yanıtlarını eşgüdümler.

Sıkı bağlantılar, en az 13 farklı insan proteinini kapsayan, **konneksin** ailesinden transmembran proteinlerle yapılmıştır. Altı konneksin, merkezinde sulu, açık bir geçit bulunan bir silindir oluşturur (Şekil 12.66). Bir hücrenin plazma zarındaki böyle bir konneksin grubu, bitişik bir hücrenin konneksinleri ile aynı hizaya gelerek, iki sitoplazma arasında açık bir kanal oluştururlar. İki hücrenin plazma zarları, konneksinlerin hücre dışı kısımlarının kapladığı alana uygun bir aralıkla ayrılır –bu nedenle, elektron mikroskopçular "aralık bağlantı" adını yakıştırdılar. Bir çok hücre, konneksin ailesinin birden fazla üyesini eksprese eder ve böylece, farklı konneksin proteinlerinin kombinasyonları çeşitli nitelikte aralık bağlantıları ortaya çıkarabilir.



Şekil 12.67 Plazmodesmata
(A) Plazmodesmatanın (oklar) elektron mikroskop görüntüsü. (B) Plazmodesmatada komşu hücrelerin plazma zarları, bitişik hücre duvarları içerisinde sitoplazmik kanallar oluşturacak şekilde, kesintisiz uzar. Genellikle bir endoplazmik retikulum uzantısı bu kanaldan geçer. (A, E.H. Newcomb, University of Wisconsin/Biological Photo Service.)

Bitki Hücresi Adezyonu ve Plazmodesmata

Bitki hücreleri arasındaki adezyon transmembran proteinlerle değil hücre duvarlarıyla gerçekleşir. Özellikle, hücre duvarındaki pektince zengin, **orta lamel** denilen özel bir bölge, bitişik hücreleri bir arada tutan bir yapıştırıcı gibi davranır. Bitki hücre duvarlarının sert olması nedeniyle, bitki hücreleri arasındaki kararlı bağlantılar, hayvan hücrelerindeki desmozomlar ve aterens bağlantılardaki gibi, hücre iskeletleri arasında bağlantı oluşumunu gerektirmez. Ancak, bitişik bitki hücreleri hayvan hücrelerindeki aralık bağlantılara benzer şekilde, **plazmodesmata** (tekil, plazmodesma) denilen sitoplazma bağlantıları aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar.

İşlevsel benzerliklerine karşın, plazmodesmatanın yapısal yönden aralık bağlantılarla ilişkisi yoktur. Her plazmodesmada, bir hücrenin plazma zarı komşu hücreninkiyle devam eder ve böylece, iki sitozol arasında açık bir kanal oluşur (Şekil 12.67). Düz endoplazmik retikulumun bir uzantısı, iyonların ve küçük moleküllerin hücreler arasında serbestçe geçebildikleri bir sitoplazma halkası bırakarak bu kanaldan geçer. Aralık bağlantılar gibi plazmodesmata da dinamik yapılardır. Uygun bir uyarıya yanıt olarak uzayabilir ve bitişik hücreler arasında makromoleküllerin denetimli geçişine olanak sağlarlar. Ayrıca, plazmodesmataya özel protein hedeflenmeleri konusunda kanıt bulunmaktadır. Plazmodesmata, böylece, transkripsiyon faktörleri ve RNA'lar gibi düzenleyici moleküllerin hücreler arasındaki trafiğini denetleyerek, bitki gelişiminde önemli bir rol oynayabilir.

ÖZET

PLAZMA ZARININ YAPISI

Fosfolipid çift tabaka: Plazma zarının temel yapısı fosfolipid çift tabakadır, glikolipidler ve kolesterol de içerir.

Zar Proteinleri: zardaki proteinler özel zar işlevlerinin yerine getirilmesinden sorumludurlar. Zarlar, proteinlerin fosfolipid çift tabaka içerisine yerleştiği bir akışkan mozaik görünümündedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomiyelin, fosfatidilinositol, glikolipid, kolesterol

akışkan mozaik modeli, periferal zar proteini, integral zar proteini, transmembran protein, porin, glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası

apikal bölge, bazolateral bölge, lipid sal

Zar Proteinlerinin Hareketliliği: Proteinler fosfolipid çift tabaka içerisinde yanlara doğru serbestçe difüze olurlar. Fakat bazı proteinlerin hareketleri, diğer proteinlerle ya da belirli lipidlerle bağlanmaları nedeniyle kısıtlıdır.Ayrıca, sıkı bağlantılar proteinlerin, epitel hücrelerinin belirgin plazma zar bölgeleri arasında hareketini engeller.

glikokaliks, selektin

Glikokaliks: Hücre yüzeyi, glikokaliks denilen bir karbohidrat mantoyla kaplıdır. Hücre yüzeyi karbohidratları, hücrelerin birbirini tanımalarını sağlayan belirleyicilerdir.

KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN TAŞINIMI

pasif difüzyon

Pasif Difüzyon: Küçük hidrofobik moleküller fosfolipid çift tabakadan difüzyon yoluyla plazma zarından geçebilirler.

kolaylaştırılmış difüzyon, taşıyıcı protein, kanal proteini

Kolaylaştırılmış Difüzyon ve Taşıyıcı Proteinler: Biyolojik moleküllerin çoğunun geçişi, polar ve yüklü moleküllerin hidrofobik iç kısımla etkileşmeden plazma zarını geçmelerini sağlayan taşıyıcı ya da kanal proteinleri aracılığıyla gerçekleşir.

iyon kanalı, ligand-kapılı kanal, voltaj-kapılı kanal,'patch clamp'yöntemi, Nernst denklemi, aksiyon potansiyeli

İyon Kanalları: İyon kanalları seçilen iyonların plazma zarından hızlı geçişini organize eder. Özellikle, elektrik uyarılarının iletiminden sorumlu oldukları kas ve sinir hücrelerinde iyi tanımlanmışlardır.

aktif taşıma, iyon pompası, Na^+-K^+ pompası, Na^+-K^+ ATPaz, ABC taşıyıcı

ATP Hidroliziyle Desteklenen Aktif Taşıma: ATP hidrolizinden elde edilen enerji, moleküllerin elektrokimyasal gradientlerine karşı taşınabilmesini sağlar.

simport, uniport, antiport

İyon Gradientiyle Yürütülen Aktif Taşıma: İyon gradienti, diğer moleküllerin aktif taşınımını desteklemek üzere sıklıkla kullanılır.

ENDOSİTOZ

endositoz, fagositoz, pinositoz, fagozom, fagolizozom

Fagositoz: Hücreler, bakteri ve hücre artıkları gibi büyük partikülleri fagositozla alırlar.

reseptör-aracılıklı endositoz, klatrin-kaplı çukur, klatrin-kaplı vezikül, ligand, düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL), akışkan fazlı endositoz, kaveola, makropinositoz,

Reseptör-Aracılıklı Endositoz: En iyi tanımlanmış endositoz şekli, özgül moleküllerin seçili alımını sağlayan, reseptör-aracılıklı endositozdur.

endozom, reseptör azaltan-regülasyon, transsitoz

Endositozda Protein Trafiği: Endositozla alınan moleküller endozomlara aktarılır ve burada, plazma zarına geri gönderilmek ya da lizozomlarda yıkılmak üzere tasnif edilirler.

HÜCRE DUVARLARI ve HÜCRE DIŞI MATRİS

peptidoglikan

Bakteri Hücre Duvarları: Bakteri hücre duvarlarının temel bileşeni, kısa polipeptidlerle birbirine bağlanmış polisakkarid zincirlerinden oluşan bir peptidoglikandır.

Bitki Hücre Duvarları: Mantar, alg ve yükse bitkilerin hücre duvarları, polisakkarid ve proteiniçeren jelimsi bir matris içerisine gömülmüş, ipliksi polisakkaridlerden (örn; sellüloz) oluşmuştur. Sert hücre duvarları, bitki hücrelerinin su alarak hızla genişlemesine olanak verir.	**kitin, sellüloz, sellüloz mikrofibrili, hemisellüloz, pektin, birincil hücre duvarı, ikincil hücre duvarı, lignin, turgor basıncı, oksin, sellüloz sentaz**
Hücre Dışı Matris: Dokuları oluşturan hayvan hücreleri, salgılanan proteinlerden ve polisakkaridlerden oluşan bir hüce dışı matrisle çevrilidir. Hücre yüzey reseptörleri, hücre-matris bağlantılarında, hücre dışı matrise bağlanarak hücre iskeletini sabitlerler	**hücre dışı matris, bazal lamina, kollajen, kollajen fibrili, prokollajen, elastik lif, elastin, glikozaminoglikan (GAG), proteoglikan, fibronektin, laminin, entaktin, nidojen, integrin, fokal adezyon, hemidesmozom**
HÜCRE-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİ	
Hücre Adezyon Proteinleri: Seçici hücre-hücre etkileşimleri dört büyük adezyon protein grubu tarafından organize edilir: selektinler, integrinler, immünglobulin süper ailesi üyeleri ve kederinler. Kaderinler, hücre-hücre bağlantılarında bitişik hücrelerin hücre iskeletlerini birbirine bağlar.	**hücre adezyon molekülü, selektin, integrin, immünglobulin (Ig) süper ailesi, kaderin, heterofilik etkileşim, homofilik etkileşim, aterens bağlantı, desmozom**
Sıkı Bağlantılar: Sık bağlantılar, epitel hücreleri arasında moleküllerin serbest geçişini önler ve plazma zarının apikal ve bazolateral bölgelerini birbirinden ayırır.	**sıkı bağlantı, bağlantı kompleksi**
Aralık Bağlantılar: Aralık bağlantılar, bitişik hücrelerin sitoplazmalarını bağlayan, açık kanallardır.	**aralık bağlantı, konneksin**
Bitki Hücresi Adezyonu ve Plazmodesmata: Bitişik bitki hücreleri birbirine, plazmodesmata adı verilen sitoplazma bağlantılarıyla, bağlıdır.	**orta lamel, plazmodesma**

Sorular

1. Kolesterolün, bir zar çift tabakasının işlevsel olabileceği sıcaklık aralığını nasıl genişlettiğini açıklayın.

2. Periferal zar proteinleri ile integral zar proteinlerini deneysel olarak nasıl ayırt edersiniz?

3. Porinlerin, bakterilerin dış zarı yerine, plazma zarına yerleştirilmesinin sonucu ne olacaktır?

4. Frye ve Edidin'in hücre-füzyonu deneyleri, zar yapısının akışkan mozaik modelini nasıl desteklemiştir? Kaynaştırdıkları hücreleri 2°C'da inkübe etmiş olsalardı nasıl bir sonuç elde ederlerdi?

5. Glikokaliksin iki ana işlevi nedir?

6. Mürekkep balığı aksonunun içinde K^+ konsantrasyonu hücre dışındakine kıyasla 20 kez daha yüksektir ve bu, -75 mV denge hali zar potansiyeli meydana getirir. Hücre içindeki K^+ konsantrasyonu dışarıdakinden sadece 10 kat fazla olsaydı, denge hali zar potansiyeli ne olurdu? Gerçek, dinlenme hali zar potansiyeli (-60 mV), -75 mV'luk K^+ denge potansiyelinden neden farklıdır?

7. Hayvan hücrelerinde Na^+-K^+ pompasının önemli işlevlerinden biri, ozmotik dengenin korunmasıdır. Bitki hücrelerinde bu neden gerekmez?

8. Ailesel hiperkolesterolemili çocukların hücreleriyle yapılan çalışmalar, bize, reseptör-aracılıklı endositozla ilgili ne gibi bilgiler sağlamıştır?

9. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında, hücre duvarları ile bitişik zarlarda ne gibi farklar vardır?

10. Bir mutajenik karsinojenle karşılaşan bir epitel hücresi, komşu epitel hücrelerine bağlantısını kaybeder, bölünür ve giderek kanser oluşturur. Komşu hücrelere bağlanma kaybına hangi gendeki mutasyon neden olmuştur?

11. Barsak epitel hücrelerinin plazma zarlarının apikal ve bazolateral bölgelerine, farklı glukoz taşıyıcıların seçilerek hedeflenmesinin önemi nedir? Bu süreçte sıkı bağlantıların rolü nedir?

12. Aralık bağlantılar ile plazmodesmata arasındaki benzerlik nedir? Hayvan ve bitkilerdeki analog yapılar mı, yoksa homolog yapılar mıdır?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Plazma Zarının Yapısı

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:27-66. [R]

Branton, D., C. M. Cohen and J. Tyler. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24: 24-32. [P]

Bretscher, M. S. and S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261: 1280-1281. [R]

Diesenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. 1985. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3-Å resolution. *Nature* 318: 618-624. [P]

Edidin, M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* 11:492-496. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121-138. [R]

Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 470-477. [R]

Jay, D. G. 1996. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell* 86: 853-854. [R]

Lasky, L. A. 1995. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflam-matory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 113-139. [R]

Lee, A. 2001. Membrane structure. *Curr. Biol.* 11:R811-R814.[R]

London, E. 2002. insights into lipid raft structure and formation from experiments inmodel membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 480-486. [R]

Magee, T. and C. Marshall. 1999. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* 98: 9-12. [R]

Montell, C., L. Birnbaumer and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkablv functional family. *Cell* 108:595-598. [R]

Rees, D. C., H. Komiya, T. O. Yeates, J. P. Allen and G. Feher. 1989. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58:607-633. [R]

Sharon, N. and H. Us. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268(1): 82-89. [R]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of intcgml proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:247-296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731. [P]

Tamm, L. K., A. Arora and J. H. Kleinschmidt. 2001. Structure and assembiy of beta-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276: 32399-32402. [R]

Thompson, T. E. and T. W. Tillack. 1985. Organization of giycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14: 361-386. [R]

Yu,]., D. A. Fischman and T. L. Steck. 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.* l:233-248. [P]

Zhang, F. L. and P. J. Casey 1996. Protein prenyiation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 241-269. [R]

Küçük Moleküllerin Taşınması

Bell, G. I., C. F. Burant, J. Takeda and G. W. Gould. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268:19161-19164. [R]

Borgnia, M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 425-158. [R]

Borst, P. and A. H. Schinkel. 1997. Genetic dissection of the function of mammalian P-giycoproteins. *Trends Genet.* 13:217-222. [R]

Carafoli, E, 1992. The Ca^{+2} pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 267: 2115-2118. [R]

Catterall, W. A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Biochem.* 64:493-531. [R]

Clapham, D. E. 1999. Unlocking family secrets: K^+ channel transmembrane domains. *Cell* 97:547-550. [R]

Cole, S. P. and R. G. Deeley 1998. Muitidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20:931-940. [R]

Cooper, E. C. and L. Y. Jan. 1999. ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects, and challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4759-4766. [R]

Doyle, D. A., J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conductivity and selectivity. *Science* 280:69-77. [P]

Gottesman, M. M. and I. M. Pastan. 1993. Biochemistry of muitidrug resistance mediated by the muitidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 385-427. [R]

Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:67-113. [R]

Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Exdtable Membranes.* 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its appiication to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 117: 500-544. [P]

Jongsma, H. J. and R. Wilders. 2001. Channel-opathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr. Biol.* 11: R747-R750.[R]

Kaplan, J. H. 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Ann. Rev. Biochem.* 71: 511-535. [R]

Lanyi, J. K. 1995. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature* 375: 461-463. [R]

MacLennan, D. H., W. J. Rice and N. M. Green. 1997. The mechanism of Ca^{+2} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{+2}-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272:28815-28818. [R]

Neher, E. and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 44-51. [R]

Perozo, E., D. M. Cortes and L. G. Cuello. 1999. Structural rearrangements underiying K^+-channel activation gating. *Science* 285:73-78. [P]

Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256:503-512, [R]

Sansom, M. S. and R. J. Law. 2001. Membrane proteins: Aquaporins—channels without ions. *Curr. Biol.* 11: R71-R73. [R]

Unwin, N. 1993. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated ion channels. Cell 72/*Neuron 10* (SuppL): 31-41. [R]

Walmsley, A. R., M. P. Barrett, F. Bringaud and G. W. Gould. 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: Structure-activity relationships. *Trends Biochem.* Sci. 23:476-481. [R]

Welsh, M. J. and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chioride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-1254. [R]

Endositoz

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47. [R]

Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: A mosaic of domains. Nat. Rev. Mol. *Cell Biol.* 2: 721-730. [R]

Liu, P., M. Rudick and R. G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277: 41295-11298. [R]

McNiven, M. A. 1998. Dynamin: A molecular motor with pinchase action. *Cell* 94: 151-154. [R]

Mostov, K., T. Su and M. ter Beest. 2003. Polarized epithelial membrane traffic: Conservation and plasticity. *Not. Cell Biol.* 5: 287-293. [R]

Nelson, W. J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258:948-955. [R]

Parton, R. G. 2003. Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:162-167. [R]

Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: An introduction. *Trends Cell Biol.* 5: 85-87. [R]

Smith, C. J. and B. M. Pearse. 1999. Clathrin: Anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* 9:335-338. [R]

Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycie: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-653. [R]

Takei, K. and V. Haucke. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors puli the trigger. *Trends Cell Biol.* 11: 385-391. [R]

Trowbridge, I. S., J. F. Collawn and C. R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:129-161. [R]

Van Ijzendoorn, S. C. D. and D. Hoekstra. 1999. The subapical compartment: A novel sorting centre? *Trends Cell Biol.* 9: 144-149. [R]

Hücre Duvarları ve Hücre Dışı Matris

Bernfield, M., M. Gotte, R W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sul- fate proteogiycans. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 729-777. [R]

Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut. 1993. Structural modeis of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-30. [R]

Cosgrove, D. J. 2001. Plant cell walls: Wall associated kinases and cell expansion. *Curr. Biol.* 11:R558-R559.[R]

Cosgrove, D. J. 1997. Assembiy and enlargement of the primary cell wall in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:171-201. [R]

Cyr, R. J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10:153-180. [R]

lozzo, R. V. 1998. Matrix proteogiycans: From molecular design to cellular function. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 609-652. [R]

Kjellen, L. and U. Lindahl. 1991. Proteogiycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 443-475. [R]

Kohorn, B. D. 2001. WAKs; cell wall assodated kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 529-533. [R]

Loftus, J. C., J. W. Smith and M. H. Ginsberg. 1994. Integrin-mediated cell adhesion: The extracellular face. *J. Biol. Chem.* 269:25235-25238. [R]

Lukashev, M. E. and Z. Werb. 1998. ECM signalling: Orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8: 437-441. [R]

McDonald, J. A. 1988. Extracellular matrix assembiy. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:183-207. [R]

Perrin, R. M. 2001. Cellulose: How many cellulose synthases to make a plant? *Curr. Biol.* 11: R213-R216. [R]

Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko. 1995. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 403-434. [R]

Reiter, W. D. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant* Biol. 5:536-542. [R]

Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteogiycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 229-255. [R]

Ruoslahti, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697-715. [R]

Stals, H. and D. inze. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6: 359-364. [R]

Varner, J. E. and L.-S. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239. [R]

Vertel, B. M. 1995. The ins and outs of aggrecan. *Trends Cell Biol.* 5: 458-464. [R]

Vuorio, E. and B. de Crombrugghe. 1990. The familv of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 59:837-872. [R]

Wight, T. N. 2002. Versican: A versatile extracellular matrix proteogiycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:617-623. [R]

Woods, A. and J. R. Couchman. 2001. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:578-583. [R]

Yurchenko, P. D. and J. C. Schnitty. 1990. Molecular architecture of basement membranes. FASEBJ. 4: 1577-1590. [R]

Hücre-Hücre Etkileşimleri

Chothia, C. and E. Y. Jones. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 66:823-862. [R]

Christofori, G. and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24: 73-76. [R]

Fukata, M. and K. Kaibucrn. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 887-897. [R]

Garrod, D. R., A. J. Merritt, and Z. Nie. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:537-545. [R]

Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava and B. E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1-44.[R]

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: The molecular basis of dssue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357. [R]

Heinlein, M. 2002. Plasmodesmata: Dvnamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 543-552. [R]

Humphries, M. J. and P. Newham. 1998. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 8: 78-83. [R]

Hynes, R. O. 2002. integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687. [R]

Knust, E. and O. Bossinger. 2002. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298:1955-1959. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4: E83-E90. [R]

Pickard, B. G. and R. N. Beachy. 1999. intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. Ceil 98: 5-8. [R]

Simon, A. M. and D. A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8: 477-483. [R]

Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocvte recirculation and leukocyte emigration: The muitistep paradigm. *Cell* 76:301-314. [R]

Stevenson, B. R. and B. H. Keon. 1998. The tight junction: Morphology to molecules. *Ann. Rev. Cell Biol.* 14: 89-109. [R]

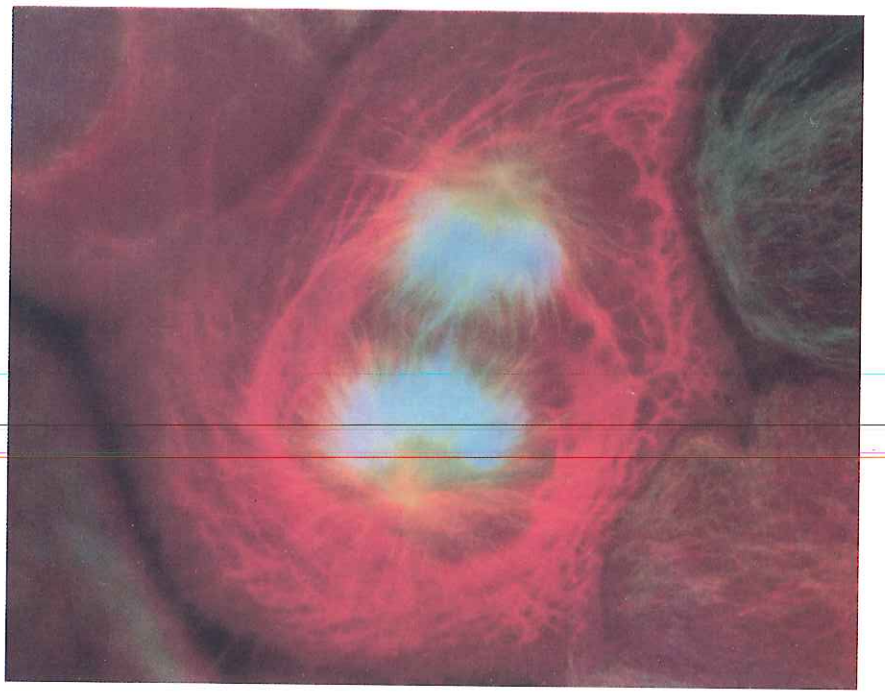
Tsukita, S. and M. Furuse. 2002. Claudinbased barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:531-536.[R]

Yagi, T. and M. Takeichi. 2000. Cadherin superfamily genes: Functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14:1169-1180. [R]

Yap, A. S. and E. M. Kovacs. 2003. Direct cadherin-activated cell signaling: A view from the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 160:11-16.[R]

Kısım IV

Hücre Regülasyonu



13 Hücre Sinyal İletimi

14 Hücre Döngüsü

15 Kanser

Bölüm 13 Hücre Sinyal İletimi

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri 541

Hücre Yüzey Reseptörlerinin Fonksiyonları 550

Hücre-İçi Sinyal İleti Yolakları 558

Sinyal İletimi ve Hücre İskeleti 571

Gelişim ve Farklılaşma Sinyal İletimi 575

Programlanmış Hücre Ölümünün Düzenlenmesi 579

ANAHTAR DENEY: Src Protein-Tirozin Kinaz 554

MOLEKÜLER TIP: Kanser: Sinyal İletimi ve *ras* Onkogenleri 572

TÜM HÜCRELER ÇEVRELERİNDEN SİNYALLER ALIRLAR ve bu sinyallere yanıt verirler. En basit bakteri bile yüksek konsantrasyonda glukoz ve amino asitler gibi besinlerin bulunduğu bölgeleri algılar ve onlara doğru yüzer. Çoğu tek hücreli ökaryotlar da diğer hücreler tarafından salgılanan sinyal moleküllerine yanıt vererek hücre-hücre haberleşmesi yaparlar. Örneğin, mayalar arasındaki döllenme sinyalleri bir hücre tarafından salgılanan peptidlerin, bir diğer hücrenin yüzeyindeki reseptörlere bağlanması ile iletilir. Ancak, çok hücreli organizmalarda hücre-hücre iletişimi gelişmişliğin en üst düzeyine ulaşmıştır. Prokaryot hücreler ve tek hücreli ökaryotlar çoğunlukla otonom olduklarına göre, çok hücreli bitki ve hayvanların her bir hücresinin davranışı organizmanın bir bütün olarak gereksinimleri karşılaması için dikkatle düzenlenmiştir. Bu bir hücrenin yüzeyinde eksprese edilen veya salgılanan değişik sinyal iletimi moleküllerinin, bir diğer hücrede eksprese olan reseptörlere bağlanması ile gerçekleştirilir, böylece birçok tek hücrenin entegre ve koordine fonksiyonları ile insan kadar kompleks organizmalar oluşur.

Birçok sinyal iletimi molekülünün reseptörlerine bağlanması, hücre metabolizması, hareketi, çoğalması, sağkalımı ve farklılaşmasını içeren, hemen tüm hücre davranışlarını düzenleyen bir seri hücre içi reaksiyonu başlatır. Bundan dolayı hücre sinyal iletimi yolaklarından sorumlu moleküler mekanizmaların anlaşılması çağdaş hücre biyolojisindeki önemli araştırma alanlarından birisi olmuştur. Bu alana ilgi pek çok kanserin normal hücre çoğalması ve sağ kalımını kontrol eden sinyal iletimi yolaklarının bozulması sonucunda ortaya çıktığının saptanması ile daha da artmıştır. Buna karşın, tıp ile hücre ve moleküler biyolojideki temel araştırmalar arasındaki bağlantıya çarpıcı bir örnek olarak- hücre sinyal iletimi mekanizmaları hakkındaki bugünkü birikimlerimizin çoğunun kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarından gelmesi verilebilir.

Sinyal İletimi Molekülleri ve Reseptörleri

Çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki bilgi alış verişini, birçok farklı tipte molekül sağlar. Bu moleküllerin tamamı hedef

hücreler tarafından eksprese edilen reseptörlerine bağlanan ligandlar olarak işlev görse de, sinyal iletimini sağlayan farklı tipteki moleküllerin yapı ve fonksiyonları arasında önemli farklılıklar vardır. Yapısal olarak, bitki ve hayvanlar tarafından kullanılan sinyal iletimi molekülleri, basit gazlardan proteinlere kadar değişen farklı karmaşıklık düzeyindedirler. Bu moleküllerden bazıları sinyalleri uzun mesafeler boyunca taşırken, bazıları komşu hücreler arasındaki bilgiyi iletilerek bölgesel etki gösterirler. Ek olarak, sinyal iletimi moleküllerinin hedef hücrelerindeki etki yolları farklıdır. Bazı sinyal iletimi molekülleri plazma zarından geçebilirler ve sitoplazmadaki veya çekirdekteki hücre içi reseptörlerine bağlanabilirler, buna karşın çoğu reseptör hedef hücre yüzeyinde sergilenir. Bu bölümde ana sinyal iletimi molekülleri ve bunların etkileşime girdiği reseptör tipleri anlatılacaktır. Bu bölümdeki daha sonraki tartışmalar, hücre davranışlarını düzenleme fonksiyonu olan hücre yüzey reseptörlerinin etki mekanizmalarına odaklanacaktır.

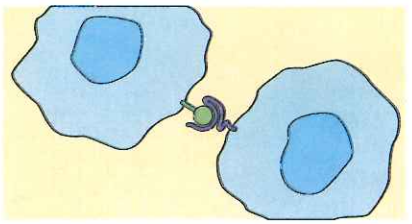
Hücre-Hücre Sinyal İletimi Tipleri

Hücre sinyal iletimi, ya bir hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan sinyal iletim molekülleri ile gerçekleşir (Şekil 13.1) Doğrudan hücre-hücre (veya hücre-matris) etkileşimleri tarafından gerçekleştirilen sinyal iletimi hayvan dokularındaki hücrelerin davranışlarının düzenlenmesinde kritik rol oynar. Örneğin, integrinler ve kaderinler (bir önceki bölümde anlatıldı) yalnızca hücre adezyon molekülü olarak fonksiyon görmezler, aynı zamanda hücre-hücre, hücre-matris bağlantılarına yanıt olarak hücre proliferasyonu ve sağ kalımını düzenleyen sinyal iletimi molekülleridir. Ek olarak, hücreler komşu hücrelerin yüzeyindeki sinyal iletimi molekülleri ile etkileşime giren çeşitli hücre yüzey reseptörleri eksprese ederler. Bu gibi doğrudan hücre-hücre etkileşimleri aracılığı ile sinyal iletimi, embriyo gelişimi sırasında ve erişkin dokuların devamlılığının sağlanmasında görev alan farklı hücre tipleri arasındaki birçok etkileşimin düzenlenmesinde kritik rol oynar.

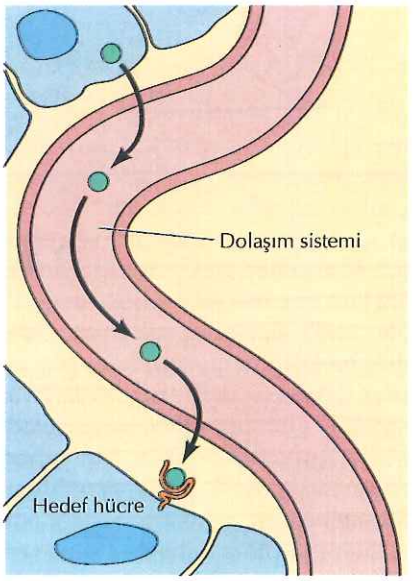
Salgılanmış moleküller ile sinyal iletiminin birçok farklı tipi, ilettiği sinyalin uzaklığı esas alınarak sıklıkla üç genel kategoride incelenir. **Endokrin sinyal iletiminde**, sinyal iletimi molekülleri **(hormonlar)** özelleşmiş endokrin hücrelerden sentezlenir ve dolaşım yoluyla taşınarak, uzak vücut bölgelerindeki hedef hücreler üzerinde etki gösterirler. Yumurtalıklarda üretilen, kadın üreme sisteminin ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesini ve devamlılığını sağlayan bir steroid hormon olan östrojen bu konudaki klasik bir örnektir. Hayvanlarda hipofiz, tiroid, paratiroid, pankreas, adrenal bezler ve gonadları içeren endokrin bezler tarafından 50 den fazla farklı hormon üretilir.

Hormonların aksine, bazı sinyal iletimi molekülleri komşu hücrelerin davranışlarını lokal olarak etkilerler. **Parakrin sinyal iletiminde**, bir hücreden salınan bir molekül, komşu hedef hücreleri etkiler. Sinir hücreleri ile sinapslar arasındaki sinyalleri taşıyan nörotransmiterlerin etkisi bu konuya örnek verilebilir. Son olarak, bazı

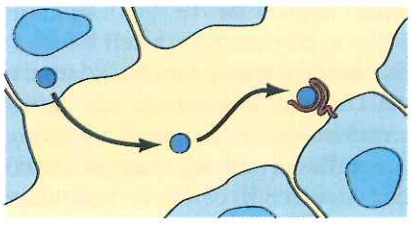
Direkt hücre-hücre sinyal iletimi



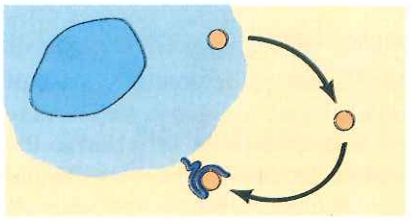
Salgılanan moleküllerle sinyal iletimi
(A) Endokrin sinyal iletimi



(B) Parakrin sinyal iletimi



(C) Otokrin sinyal iletimi



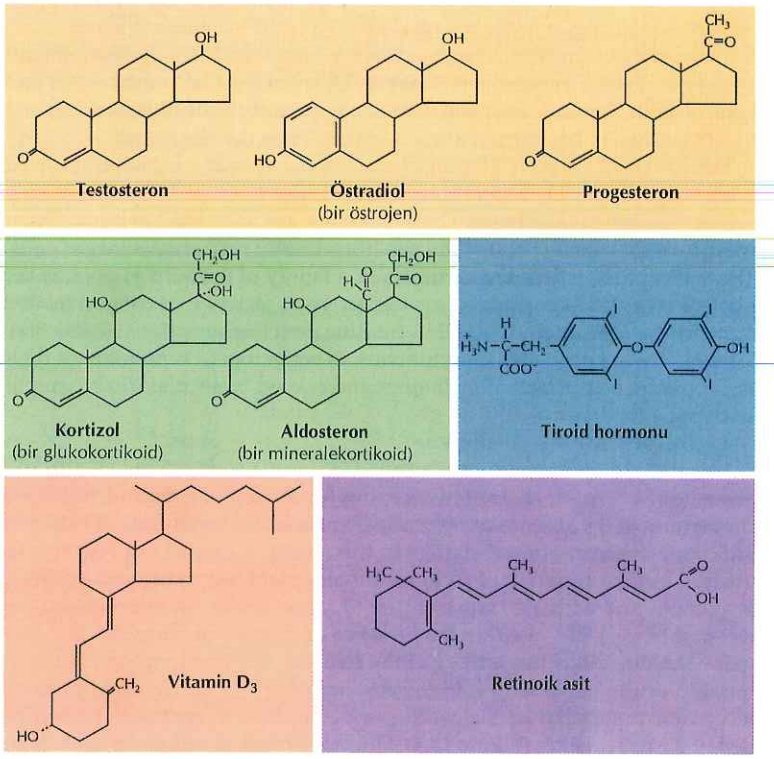
Şekil 13.1 Hücre-hücre sinyal iletimi tipleri
Hücre sinyal iletimi ya doğrudan hücre-hücre teması yoluyla ya da salgılanmış sinyal iletimi molekülleri aracılığıyla gerçekleşir.(A) Endokrin sinyal iletimi, hormonlar uzaktaki hedef hücrelerine dolaşım sistemi yoluyla taşınırlar. (B) Parakrin sinyal iletimi, bir hücreden salınan bir molekül komşu hedef hücreleri lokal olarak etkiler. (C) Otokrin sinyal iletimi, bir hücre ürettiği sinyal iletimi molekülüne kendisi yanıt verir.

hücreler kendi ürettikleri sinyal iletimi moleküllerine yanıt verirler. Bu gibi **otokrin sinyal iletimine** önemli bir örnek, omurgalı bağışıklık sistem hücrelerinin yabancı antijenlere yanıtıdır. Belli bazı T lenfosit tipleri antijenik uyarıya yanıt olarak kendi çoğalmalarını uyaran bir büyüme faktörü sentezlerler, böylece o antijene yanıt veren T lenfosit sayısını artar ve bağışık yanıt amplifiye olur. Anormal otokrin sinyal iletiminin sıklıkla kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına katkıda bulunması da dikkate değerdir. (bkz. Bölüm 15). Bu durumda, bir kanser hücresi kendi yanıt verdiği bir büyüme faktörünü üretir, böylece kendisinin kontrolsüz çoğalmasını sürekli olarak uyarır.

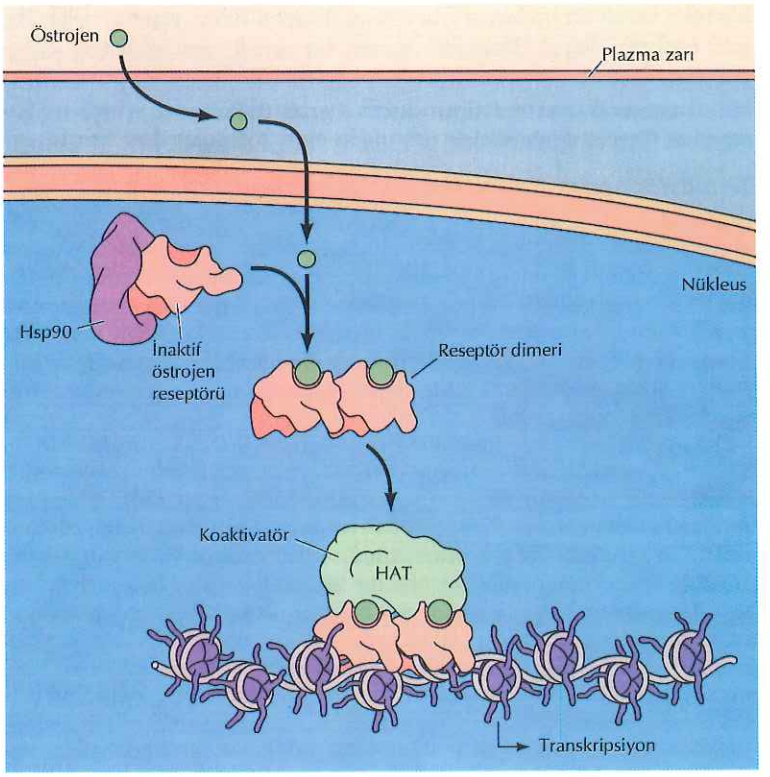
Steroid Hormonlar ve Nükleer Reseptör Süper Ailesi

Daha önce de belirtildiği gibi, bütün sinyal iletimi molekülleri hedef hücreleri üzerinde eksprese olan reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Pek çok durumda, bu reseptörler hedef hücre yüzeylerinde eksprese edilirler, ancak bazı reseptörler sitozol veya nükleusda yerleşebilen hücre içi proteinlerdir. Bu hücre içi reseptörler plazma zarını doğrudan geçebilen, küçük hidrofobik sinyal iletimi moleküllerine yanıt verirler. Tiroid hormonunu, vitamin D_3'ü ve retinoik asidi de içeren **steroid hormonlar**, bu grup sinyal iletimi moleküllerine klasik bir örnektir (Şekil 13.2).

Steroid hormonların (testosteron, östrojen, progesteron, kortikosteroidler ve ekdizon) tamamı kolesterolden sentezlenir. **Testosteron**, **östrojen** ve **progesteron** gonadlar tarafından üretilen cinsiyet steroidleridir. **Kortikosteroidler** adrenal bez tarafından üretilirler. Bu grup, çok sayıda hücrede glukoz üretimini uyaran **glukokortikoidleri** ve böbrekte tuz ve su dengesini düzenleyen **mineralokortikoidleri** de içerir. **Ekdizon** larvadan erişkine metamorfozu tetikleyerek gelişimde anahtar rol oynayan bir böcek hormonudur. **Brasinosteroidler** hücre büyüme ve farklılaşmasını



Şekil 13.2 Steroid hormonların, tiroid hormonunun, vitamin D_3 ün ve retinoik asidin yapısı
Steroidler, cinsiyet hormonlarını (testosteron, östrojen ve progesteron), glukokortikoidleri ve mineralokortikoidleri içerir.



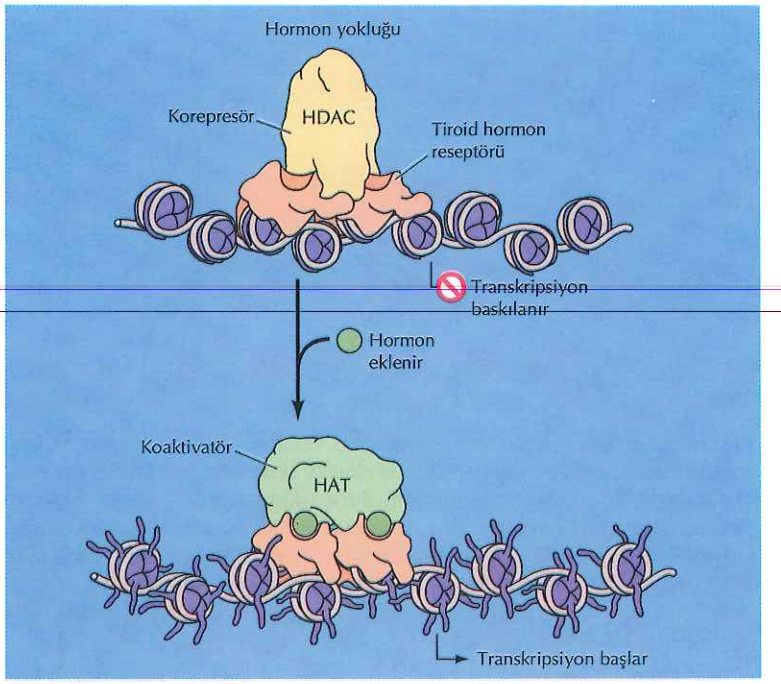
Şekil 13.3 Östrojenin etkisi
Östrojen plazma zarından geçer ve çekirdekteki reseptörüne bağlanır. Hormon olmadığında, östrojen reseptörü Hsp90'a bağlanır. Östrojenin bağlanması ile reseptör HSP90'dan ayrılır ve reseptör dimerleri oluşur. Dimerler DNA'ya bağlanır, histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatörler ile etkileşime girer ve hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarır.

içeren çok sayıda gelişimsel süreci kontrol eden bitki spesifik steroid hormonlardır.

Her ne kadar tiroid hormon, vitamin D_3'ü ve retinoik asid yapısal ve işlevsel olarak steroidlerden farklı iseler de, hedef hücrelerindeki genel etki mekanizması aynıdır. **Tiroid hormon** tiroid bezinde tirozinden sentezlenir; metabolizmanın gelişimi ve düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. **Vitamin D_3** Ca^{+2} metabolizmasını ve kemik gelişimini düzenler. Vitamin A dan sentezlenen **retinoik asid** ve ilişkili bileşikler (**retinoidler**) omurgalıların gelişiminde önemli roller oynarlar.

Hidrofobik özelliklerinden dolayı, steroid hormonlar; tiroid hormon, Vitamin D_3 ve retinoik asid plazma zarından difüzyon ile hücre içine girebilme yeteneğindedirler. Bir kez hücre içine girince, hormona yanıt veren hedef hücrelerde eksprese edilen hücre içi reseptörlerine bağlanırlar. **Nükleer reseptör süperailesi** olarak da bilinen bir protein ailesinin üyesi olan bu reseptörler; liganda bağlanma, DNA'ya bağlanma ve transkripsiyonel aktivasyon için bölgeler içeren transkripsiyon faktörleridir. Ligand bağlanması bu moleküllerin, hedef genlerinin represörü ya da aktivatörü olarak fonksiyon görmesini düzenler.

Ligand bağlanması farklı reseptörler üzerinde değişik etkiler oluşturur. Steroid reseptör ailesinin bazı üyeleri, hormonları olmadığında DNA'ya bağlanamazlar. Örneğin, östrojen reseptörü, hormon olmadığında Hsp90 şaperonlarına bağlanır (Şekil 13.3). Östrojenin bağlanması reseptörde bir konformasyonel değişikliği uyarır, bu değişiklik Hsp90 dan ayrılmasını, regülatör DNA dizilerine bağlanan ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden reseptör dimerlerinin oluşumunu sağlar. Diğer bazı durumlarda, reseptör hormon olsa da olmasa da DNA'ya bağlanır, fakat hormona bağlanması reseptörün transkripsiyonu düzenleyen bir molekül olarak



Şekil 13.4 Tiroid hormon reseptörü ile gen düzenlenmesi
Tiroid hormon reseptörü hormon olsa da olmasa da DNA'ya bağlanır. Ancak hormon bağlanması reseptörün fonksiyonunu hedef gen transkripsiyonu için bir represörden bir aktivatöre değiştirir. Reseptör hormon olmadığı zaman histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi olan bir korepresör ile bağlanır. Hormon varlığında, reseptör histon asetil transferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatör ile bağlanır.

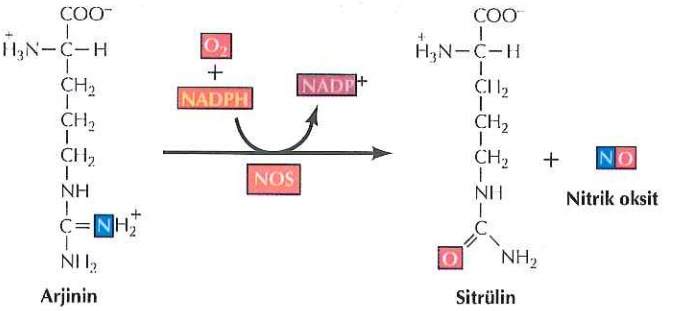
aktivitesini değiştirir. Örneğin, hormon yokluğunda tiroid hormon reseptörü hedef genlerinin transkripsiyonunu baskılayan bir korepresör kompleksi ile etkileşimdedir (Şekil 13.4). Hormon bağlanması, reseptörün korepresörden çok koaktivatörü ile etkileşimi ile sonuçlanan ve tiroid hormonu tarafından-uyarılabilir bir konformasyonel değişimini uyarır.

Nitrik Oksit ve Karbon Monoksit

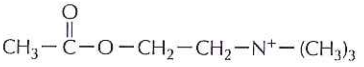
Basit bir gaz olan nitrik oksit (NO) sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve dolaşım sistemi için önemli bir sinyal iletimi molekülüdür. Steroid hormonlar gibi, NO de, hedef hücresinin plazma zarından doğrudan difüzyonla hücre içine girebilir. Bununla birlikte, NO'in etkisinin moleküler temeli, steroidlerin etkisinden farklıdır; NO transkripsiyonu düzenleyen bir reseptöre bağlanmak yerine, hücre içi hedef enzimlerin aktivitesini değiştirir.

Nitrik oksid arjinin amino asidinden nitrik oksid sentaz enzimi tarafından sentezlenir (Şekil 13.5). Bir kez sentezlenince, NO hücreden dışarıya çıkar ve komşu hücreleri bölgesel olarak etkileyebilir. NO'in etkisi, çok kararsız olması ve yarılanma ömrünün yalnızca birkaç saniye sürmesi nedeniyle bu gibi lokal etkiler ile sınırlıdır. NO'in ana hücre içi hedefi guanil siklazdır. NO bu enzimin aktif merkezindeki bir "hem" grubuna bağlanır, bir ikinci mesajcı olan siklik GMP sentezini uyarır (bu bölümde daha sonra tartışılmıştır). Ek olarak, NO sistein rezidülerinin nitrozillenmesi ile bazı hedef proteinleri doğrudan modifiye edebilir. NO'in etkisini en iyi tanımlayan örneklerden birisi, kan damarlarının genişlemesi için sinyal iletimidir. Bu olaydaki birici basamak, kan damarlarının duvarındaki sinir hücrelerinin sonlarından, asetilkolin gibi bir nörotransmiterin salınımıdır. Bu nörotransmiterler endotel hücreleri üzerinde NO sentezini uyarıcı etki yapar. Böylece NO guanil siklazı aktive edeceği yer olan komşu düz kas hücrelerine diffüze olur ve sonuçta kas hücrelerinin gevşemesini ve kan damarlarının

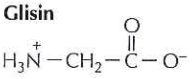
Şekil 13.5 Nitrik oksid sentezi
Nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi arjininden nitrik oksid oluşumunu katalizler.



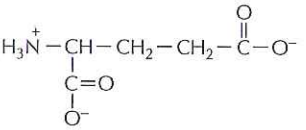
Asetilkolin



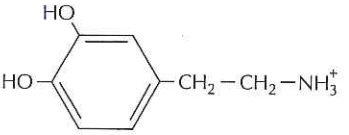
Glisin



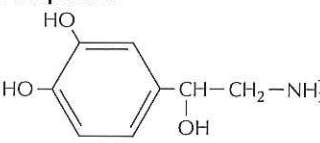
Glutamat



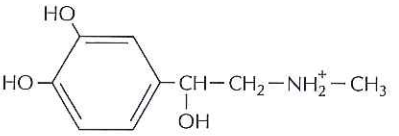
Dopamin



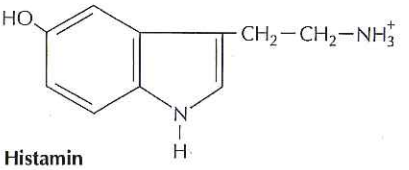
Norepinefrin



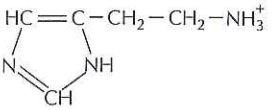
Epinefrin



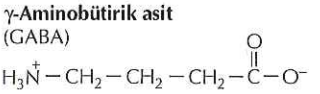
Serotonin



Histamin



γ-Aminobütirik asit
(GABA)



genişlemesini uyaran siklik GMP sentezlenir. Örneğin, NO penil ereksiyona yol açan kan damarlarının genişlemesi için sinyal iletiminden sorumludur. Kalp hastalıklarının tedavisinde nitrogliserinin tıbbi kullanımının, kroner kan damarlarını genişleten ve kalbe kan akımını artıran NO'e dönüşmesi temeline dayanması da ilgi çekicidir.

Bir diğer basit gaz olan karbon monoksit (CO) de sinir sisteminde sinyal iletimi molekülü olarak işlev görür. CO, NO ile çok yakından ilişkilidir ve kan damarlarının genişlemesinde bir nörotransmiter ve mediyatör olarak benzer roller oynuyor gibi görünmektedir. Beyin hücrelerinde CO sentezi, NO deki gibi, nörotransmiterler tarafından uyarılır. Ek olarak CO sinyal iletiminin ana fizyolojik hedefi olan guanilat siklazı uyarabilir.

Sinirsel İleticiler (Nörotransmiterler)

Nörotransmiterler nöronlar arasında veya bir nörondan diğer tiplerdeki hedef hücrelere (kas hücreleri gibi) sinyaller taşırlar. Asetilkolin, dopamin, epinefrin (adrenalin), serotonin, histamin, glutamat, glisin ve γ-aminobütirik asid (GABA) nın da içinde yer aldığı farklı bir küçük hidrofilik moleküller grubudur (Şekil 13.6). Sinirsel ileticilerin salınımı, bir aksiyon potansiyelinin bir nöronun sonuna ulaşımı ile sinyallenir (bkz. Şekil 12.22). Böylece sinirsel ileticiler sinaptik aralığın içine diffüze olurlar ve hedef hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanırlar. Bazı nörotransmiterler hormonlar olarak da görev alabilirler. Örneğin epinefrin, hem bir nörotransmiter, hem de adrenal bezler tarafından üretilen ve kas hücrelerinde glikojen yıkım sinyali olan bir hormon olarak fonksiyon görür.

Sinirsel ileticiler hidrofilik moleküller olduklarından, hedef hücrelerin plazma zarından geçemezler. Bu nedenle, steroid hormonların ve NO veya CO'in aksine, nörotransmiterler hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Çoğu sinirsel iletici reseptörleri, bir önceki bölümde tartışılan asetilkolin reseptörü gibi (bkz. Şekil 12.23), ligand-kapılı iyon kanallarıdır. Sinirsel ileticilerin reseptörlerine bağlanması iyon kanallarının açılmasını sağlayan bir konformasyonel değişikliği uyarır, bu durum hedef hücre içinde iyon akışının değişmesi ile sonuçlanır. Diğer nörotransmiter reseptörleri, hücre yüzey reseptörleri ile çeşitli hücre içi yanıtlar arasındaki bağlantıyı sağlayan ana sinyal iletimi molekül gruplarından birisi olan (bu bölümde daha sonra tartışılacak), G proteinleri ile birlikte çalışırlar. Sinirsel iletici reseptörlerinde, ilişkili G proteinleri sıklıkla iyon kanallarının aktivitelerini indirekt olarak düzenlerler.

Şekil 13.6 Sinirsel ileticilerin genel yapısı
Nörotransmiterler hücre yüzey reseptörlerine bağlanan hidrofilik moleküllerdir.

TABLO 13.1 Bazı Peptid Hormonlar, Nöropeptidler ve Büyüme Faktörleri

Sinyal İletimi Molekülü	Boyutu[a]	Etkileri [b]
Peptid Hormonlar		
İnsülin	A= 21, B=30	Glukoz alımının düzenlenmesi, hücre çoğalmasının uyarılması
Glukagon	29	Glukoz sentezinin uyarılması
Büyüme Hormonu	191	Genel büyüme uyarımı
Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH)	α= 92, β= 118	Oositlerin ve over foliküllerinin büyümesinin uyarılması
Prolaktin	198	Süt üretiminin uyarılması
Nöropeptidler ve nörohormonlar		
P maddesi	11	Duyu sinaps geçişi
Oksitosin	9	Düz kas kasılmasının uyarımı
Vazopresin	9	Böbreklerde su geri emiliminin uyarılması
Enkefalin	5	Analjezik
β-Endorfin	31	Analjezik
Büyüme Faktörleri		
Sinir büyüme faktörü (NGF)	118	Sinir hücrelerinin farklılaşması ve sağ kalımı
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	53	Birçok farklı tipteki hücrenin çoğalması
Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF)	A=125, B= 109	Fibroblastların ve diğer bazı hücre tiplerinin çoğalması
İnterlökin-2	133	T lenfositlerin proliferasyonu
Eritropoietin	166	Kırmızı kan hücrelerinin gelişimi

[a] Boyut, amino asid sayısı anlamına gelmektedir. Bazı hormonlar ve büyüme faktörleri iki farklı polipeptid zinciri içerirler, bunlar A ve B, veya α ve β olarak gösterilmiştir.

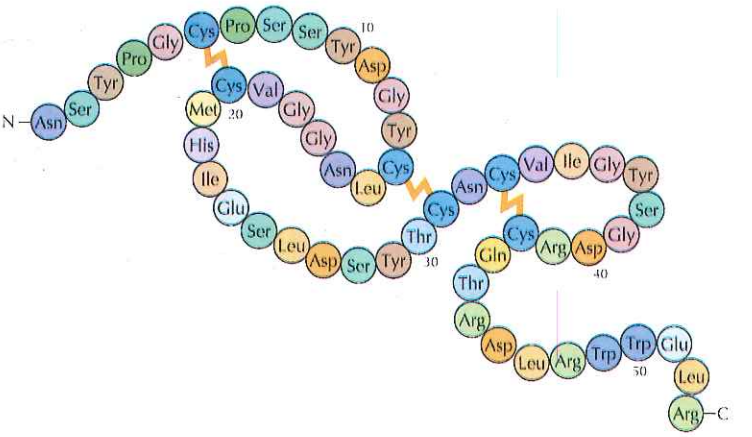
[b] Bu hormon ve büyüme faktörlerinin çoğunun burada tanımlanmayan ek bazı etkileri de vardır.

Peptid Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Hayvanlarda en geniş çeşitlilik gösteren sinyal iletimi molekülleri, boyutları birkaç amino asid ile yüzden fazla amino asid arasında değişen peptidlerdir. Bu grup sinyal iletimi molekülleri peptid hormonları, nöropeptidleri ve bir dizi farklı polipeptid büyüme faktörlerini içerir (Tablo 13.1). **Peptid hormonlar** için en iyi bilinen örnekler; insülin, glukagon ve hipofiz bezi tarafından üretilen hormonları (büyüme hormonu, folikül-stimüle edici hormon, prolaktin ve diğerleri) içerir.

Nöropeptidler bazı nöronlardan, bir önceki bölümde bahsedilen küçük-moleküllü nörotransmiterler yerine salınırlar. Bu peptidlerin **enkefalinler** ve **endorfinler** gibi bazıları, sinapslarda nörotransmiter olarak fonksiyon görmeleri yanı sıra, uzak hücreler üzerinde etkili **nörohormonlar** olarak da işlev görürler. Enkefalinler ve endorfinler merkezi sinir sisteminde ağrı yanıtını azaltan doğan analjezikler olarak aktivite göstermeleri nedeniyle çok yaygın olarak çalışılmaktadır. İlaç bağımlılığı çalışmaları sırasında keşfedilen bu moleküller, beyin hücreleri yüzeyindeki morfinin bağlandığı reseptörlere bağlanan, doğal olarak oluşan bileşiklerdir.

Polipeptid **büyüme faktörleri** hayvan hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden çok sayıda sinyal iletimi molekülünü içermektedir. Bu faktörleden ilki, 1950'lerde Rita–Levi Montalcini tarafından keşfedilen **sinir büyüme faktörü** ya da **NGF** dür. NGF, **nörotrofinler** olarak adlandırılan, nöronların gelişimi ve sağ kalımını düzenleyen bir polipeptid ailesinin üyelerinden birisidir. NGF deneyleri sürecinde, Stanley Cohen, rastlantısal olarak **epidermal büyüme faktörü** ya da **EGF** olarak adlandırılan hücre çoğalmasını uyaran ilişkisiz bir faktörü keşfetti. EGF, 53 amino asitlik bir polipeptid olan (Şekil 13.7), hem embriyonik gelişim sırasında hem de erişkin organizmada hayvan hücrelerinin proliferasyonunu kontrol etmede kritik rollere sahip büyük bir dizi büyüme faktörünün prototipi oldu.



Şekil 13.7 Epidermal büyüme faktörünün (EGF) yapısı
EGF, 53 amino asitten oluşan bir polipeptid zinciridir. Sistein birimleri arasında disülfid bağları gösterilmiştir (G.Carpenter ve S.Cohen, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 48:193).

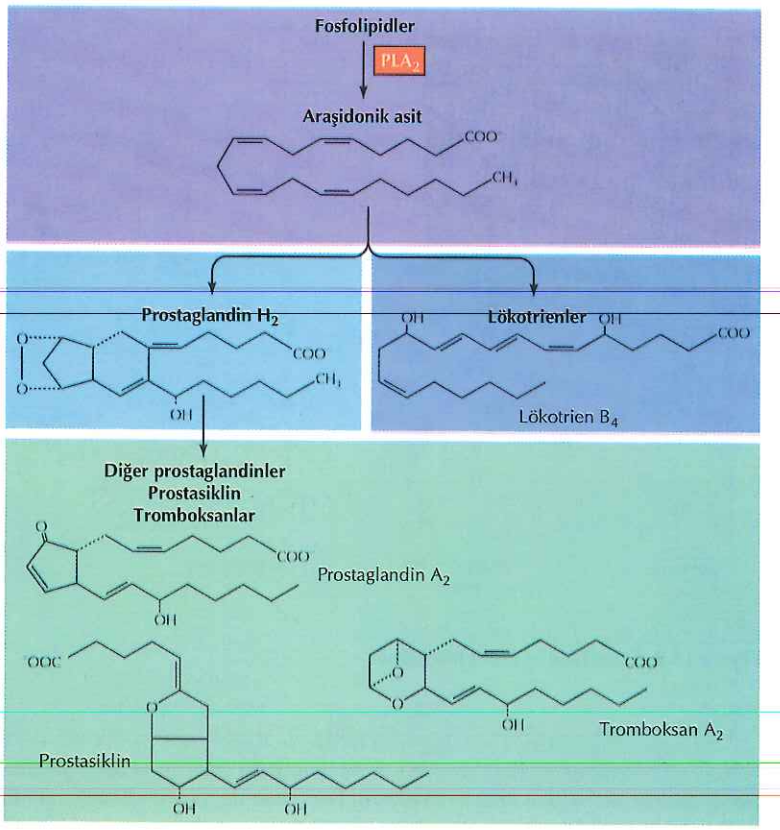
Platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF)'nün yara iyileşmesindeki aktivitesi ile büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren iyi bir örnek elde edildi. PDGF kanda trombositlerde depolanmakta ve yara bölgesindeki kan pıhtılaşması sırasında salınmaktadır. PDGF salındığı zaman pıhtı yakınındaki fibroblastların proliferasyonunu uyarmakta, böylece hasarlı dokunun yenilenmesine katkıda bulunmaktadır. **Sitokinler** denilen bir diğer büyük polipeptid büyüme faktörü grubu üyeleri, kan hücrelerinin gelişim ve farklılaşmasını düzenlerler ve bağışık yanıt sırasında lenfositlerin aktivitesini kontrol ederler. Diğer polipeptid büyüme faktörleri (**zarlara-tutunmuş büyüme faktörleri**) hücre dışı sıvılara salınmaktan çok plazma zarı ile bağlantılı kalırlar, bundan dolayı doğrudan hücre-hücre etkileşimleri sırasında spesifik olarak sinyal iletimi molekülleri olarak fonksiyon görürler.

Peptid hormonlar, nöropeptidler ve büyüme faktörlerinin hedef hücrelerinin plazma zarlarını geçme yetenekleri yoktur, bu yüzden etkilerini, bu bölümde daha sonra da bahsedileceği gibi, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Polipeptid büyüme faktörlerinin hücre çoğalması kontrolündeki kritik rollerinden de tahmin edilebileceği gibi, büyüme faktörü sinyal iletimindeki anormallikler pek çok kanser tipini de içeren çok sayıda hastalığın temel nedenidir. Örneğin, EGF reseptör ailesi üyelerinden birisinin anormal ekspresyonu pek çok insan meme ve yumurtalık kanserlerinin gelişiminde önemli bir faktördür.

Ökosanoidler

Steroid hormonların aksine birçok lipid, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etki gösteren sinyal iletimi molekülleri olarak iş görürler. Bu moleküllerin en önemlileri, **ökosanoidler** olarak adlandırılan **prostoglandinler, prostasiklinler, tromboksanlar ve lökotrienleri** içeren bir lipid ailesidir (Şekil 13.8). Ökosanoidler hızla yıkılabilmeleri nedeniyle otokrin ya da parakrin sinyal ileti yolaklarında lokal etkilidirler. Hedef hücrelerinde kan trombositlerinin kümelenmesi, yangı ve düz-kas kasılmasını da içeren çok sayıda yanıtı uyarırlar.

Tüm ökosanoidler fosfolipidlerden yapılmış olan araşidonik asitten sentezlenirler. Prostoglandin ya da tromboksanların sentezindeki yolakta birinci basamak, araşidonik asidin prostoglandin H_2 ye dönüşümüdür. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim (siklooksijenaz) aspirinin ve diğer nonsteroid anti-inflamatuar ilaçların hedefidir. Aspirin prostoglandinlerin sentezini inhibe ederek inflamasyon ve



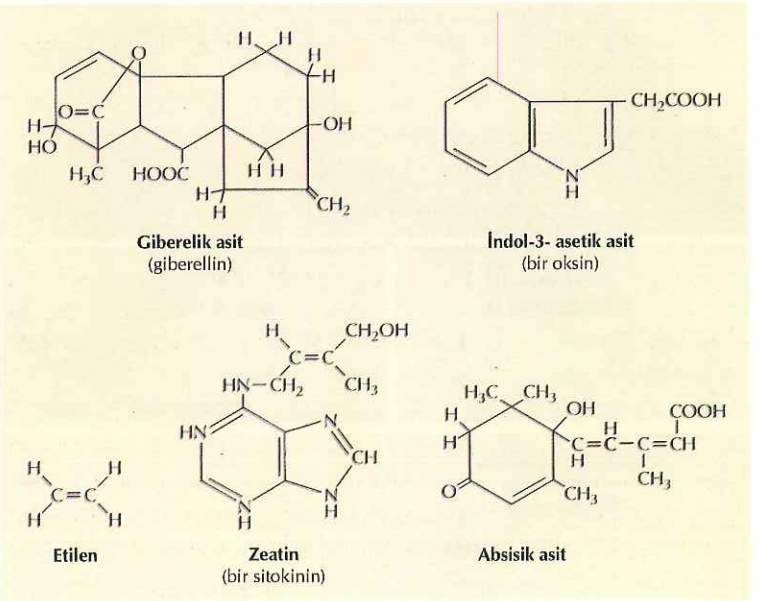
Şekil 13.8 Ökosanoidlerin sentezi ve yapısı
Ökosanoidler prostoglandinleri, prostasiklin, tromboksanlar ve lökotrienleri içerir. Araşidonik asid fosfolipidlerin fosfolipaz A_2 (PLA_2) tarafından katalizlenmiş hidrolizi sonucunda sentezlenirler. Araşidonik asid daha sonraiki alternatif yolak aracılığı ile metabolize edilebilir; bir yolak prostoglandinler, prostasiklin ve tromboksanların oluşumunu sağlarken, diğer yolak lökotrienlerin sentezine neden olur.

ağrıyı azaltır. Aspirin aynı zamanda tromboksan sentezini inhibe ederek trombosit kümelenmesini ve kan pıhtılaşmasını azaltır. Bu aktivitelerinden dolayı, inmeden korunmak için sıklıkla günlük düşük dozda aspirin önerilir. Ek olarak, aspirin ve nonsteroid anti-inflamatuar ilaçların hem hayvan modellerde hem de insanlarda kolon kanseri sıklığını, büyük olasılıkla hücre proliferasyonunu uyaran ve kanser gelişimini başlatan prostoglandinlerin sentezini baskılayarak, azalttığı bulunmuştur.

Bitki Hormonları

Bitki büyümesi ve gelişimi **bitki hormonları** denilen bir grup küçük molekül tarafından düzenlenir. Bu moleküllerin bitkideki düzeyleri ışık veya enfeksiyon gibi çevresel faktörler tarafından modifiye edilir, böylece çevresel sinyaller, bitkinin farklı bölgelerindeki dokulardaki yanıtları koordine ederler.

Bitki hormonları, son yıllarda bitki steroid hormonları gibi birçok ek bitki hormonları keşfedilmiş olsa da, klasik olarak beş ana gruba ayrılır: **oksinler, giberellinler, sitokininler, absisik asit** ve **etilen** (Şekil 13.9). İlk bitki hormonu olarak tanımlanan oksinin keşfine öncülük eden ilk deneyler 1880'lerde Charles Darwin tarafından gerçekleştirilmiştir. Oksinin etkilerinden birisi, hücre duvarını zayıflatarak bitki hücresinin uzamasını uyarmasıdır (bkz. Şekil 12.50). Ek olarak, oksinler, bitki gelişiminin hücre bölünmesi ve farklılaşmasını da içeren pek çok diğer yönünü de düzenlerler. Diğer bitki hormonları benzer bir şekilde hedef hücreleri üzerinde kök uzaması (giberellinler), meyve olgunlaşması (etilen), hücre bölünmesi (sitokininler) ve tohum oluşumunun başlamasını (absisik asit) da içeren çok çeşitli etkiler gösterirler.

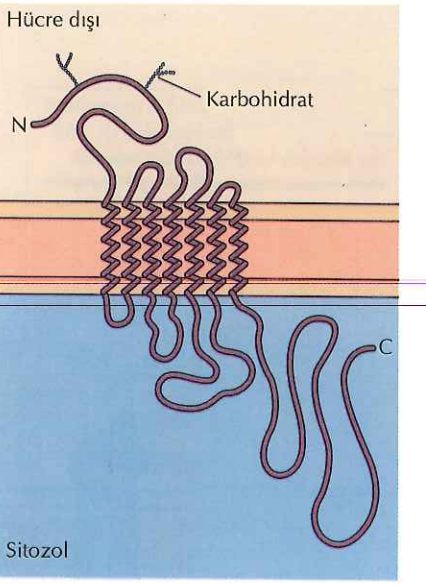


Şekil 13.9 Bitki hormonlarının yapısı

Bu hormonların bitkilerde tetiklediği sinyal ileti yolakları, hayvan hücrelerinde de korunmuş olan çok sayıdaki ortak mekanizmayı kullanırken, az sayıda eleman yalnızca bitkilere özgüdür. Örneğin, çok iyi anlaşılmış yolaklardan birisi, *Arabidopsis thaliana*'nın genetik analizi ile elde edilmiş olan, bitki hücrelerinin etilene yanıt sinyalleridir. Bu yolağın elemanları, bitki hücresi yüzeyindeki bir etilen reseptörünü, hayvan hücrelerindeki Raf proteini ile ilişkili bir protein kinazı ve etilen-yanıt genlerinin ekspresyonlarını düzenleyen yeni bir transkripsiyon faktörünü içerir.

Hücre Yüzey Reseptörlerinin Fonksiyonları

Daha önce de gözden geçirildiği gibi, hücre-hücre sinyal iletiminden sorumlu çoğu ligand (nörotransmiterler, peptid hormonlar ve büyüme faktörleri) hedef hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar. Hücre-hücre sinyal iletimini anlamada en önemli hedeflerinden birisi, hücre yüzey reseptörlerine ligand bağlanması ile başlatılan sinyal ileti mekanizmalarının aydınlatılmasıdır. Bölüm 12'de tartışıldığı gibi, bazı nörotransmiter reseptörler plazma zarından iyon geçişini doğrudan kontrol eden ligand kapılı iyon kanallarıdır. Peptid hormonların ve büyüme faktörlerinin reseptörlerini de içeren diğer hücre yüzey reseptörleri, hücre içi proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek etki gösterirler. Bu proteinler reseptörden aldıkları sinyalleri, transkripsiyon faktörlerini de içeren bir dizi ek hücre içi hedefe iletirler. Bu yüzden, ligandın hücre yüzeyindeki bir reseptöre bağlanması, sonuçta hedef hücre nükleusuna ulaşarak gen ekspresyonunda programlanmış değişikliklerin oluşumunu hedefleyen bir hücre içi reaksiyonlar zincirini başlatır. Bu bölümün daha sonraki kısımlarında ana hücre yüzey reseptörlerinin fonksiyonları, bu reseptörlerin aşağı yönündeki (=downstream) hücre içi sinyal ileti yolakları ile birlikte tartışılacaktır.



Şekil 13.10 G proteini-eşlikli reseptörlerin yapısı
G proteini eşlikli reseptörler zarı yedi kez geçen α heliksleri ile tanımlanırlar.

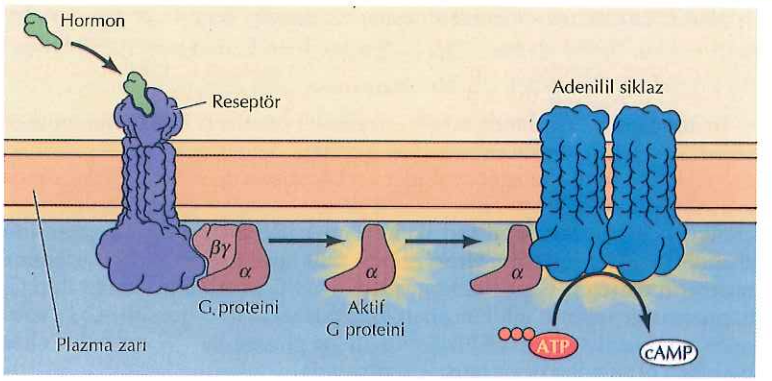
G Proteini- Eşlikli Reseptörler

Hücre yüzey reseptörlerinin en geniş ailesi, sinyalleri hücre içi hedeflerine, **G proteinleri** olarak adlandırılan guanin nükleotid-bağlayan proteinler aracılığıyla iletirler. Ökosanoid reseptörlerini, çoğu nörotransmiter, nöropeptid ve peptid hormonların reseptörlerini de içeren binden fazla bu tip **G proteini- eşlikli reseptör** tanımlanmıştır. Ek olarak, koku alma, görme ve tat almadan sorumlu çok sayıda reseptör de G proteini- eşlikli reseptör ailesi içindedir.

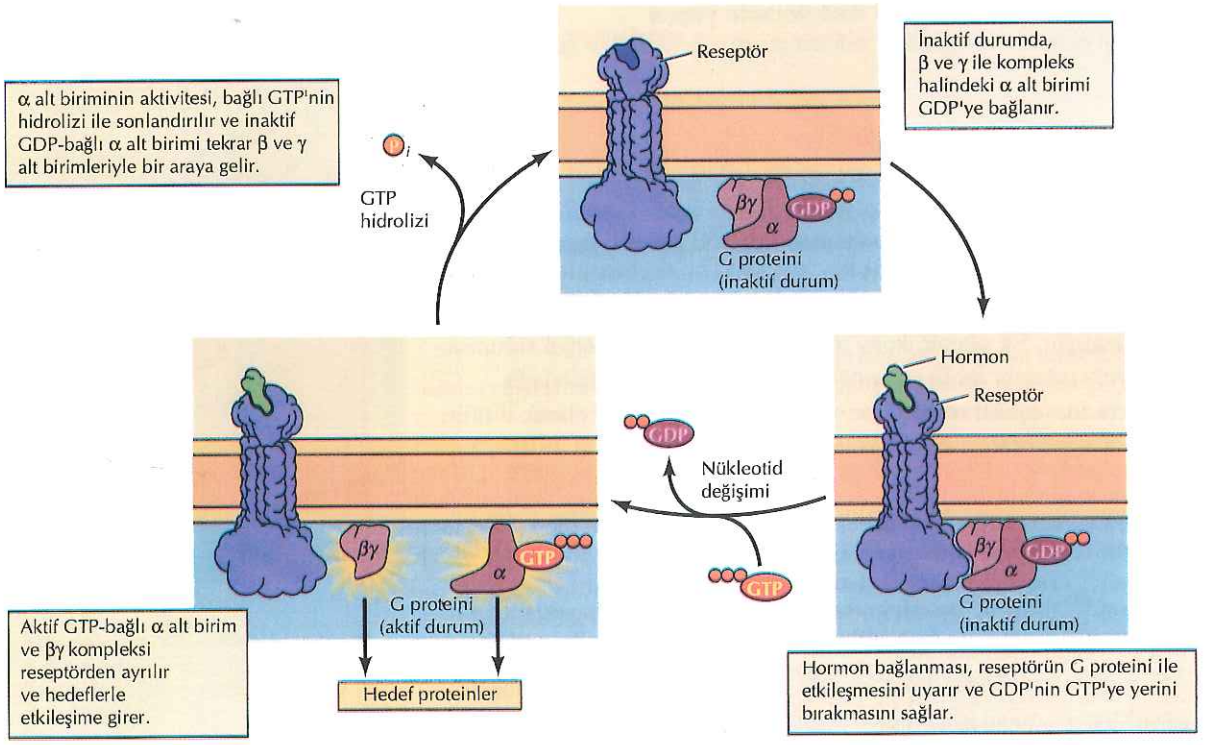
G proteini- eşlikli reseptörler, yapısal ve fonksiyonel olarak ilintili zarı yedi kez geçen α-heliks yapı ile tanımlanırlar (Şekil 13.10). Bu reseptörlerin hücre dışı bölümlerine ligandlarının bağlanması, reseptörün sitozoldeki bölgesinin, plazma zarının iç yüzeyine bağlı bir G proteini ile birleşmesini sağlayan bir konformasyon değişikliğine neden olur. Bu etkileşim G proteinini uyarır, uyarılan G proteini reseptörden ayrılır ve sinyali bir hücre içi hedefe taşır. Hedef bir enzim veya bir iyon kanalı olabilir.

G proteinleri, hedef hücrelerinde siklik AMP (cAMP) sentezini düzenleyen hormonlarla (epinefrin gibi) yapılan çalışmalar sonucunda keşfedildi. Bu bölümde daha sonra da tartışılacağı gibi, cAMP çok sayıda farklı hormona hücresel yanıtı düzenleyen önemli bir ikinci mesajcıdır. Martin Rodbell ve meslektaşları 1970'lerde adenilil siklazın (cAMP oluşumundan sorumlu enzim) hormonal uyarımı için GTP nin gerekli olduğunu gözlemlediler. Bu bulgu, adenil siklaz aktivasyonu için aracı bir molekül olarak bir guanin nükleotid-bağlayan proteinin (bir G proteini) keşfine ışık tuttu (Şekil 13.11). O zamandan günümüze, farklı hücre dışı sinyallere yanıt olarak birçok farklı hücre içi hedefin aktivitesini düzenleyen fizyolojik değiştiriciler olarak rol oynayan bir dizi G protein bulundu.

G proteinleri; α, β ve γ olarak tanımlanan üç alt birim içerirler (Şekil 13.12). Bu bölümden sonra tartışılacak olan Ras proteini gibi diğer guanin nükleotid-bağlayan proteinlerden ayırt edilebilmeleri için **heterotrimerik G proteinleri** olarak adlandırılırlar. α alt birimi G proteininin aktivitesini düzenleyen guanin nükleotidlere bağlanır. Dinlenme halinde α alt birimi, β ve γ ile kompleksi halinde, GDP ye bağlıdır. Hormon bağlanması reseptörde şekil değişikliğini uyarır,



Şekil 13.11 Adenilil siklazın hormonlar ile aktivasyonu
Hormonun bağlanması reseptörlerin bir G proteini ile etkileşimini başlatır. Aktive edilen G proteinin α alt birimi reseptörden ayrılır ve adenilil siklazı uyarır, bu da ATP nin cAMP'ye dönüşümünü katalizler.



Şekil 13.12 G proteinlerinin düzenlenmesi

örneğin reseptörün sitozoldeki bölümü G proteini ile etkileşime girer ve bağlı GDP'nin salınımını ve GTP ile yer değiştirmesini uyarır. Aktive edilmiş GTP-bağlı α alt birimi β ve γ dan ayrılarak bir arada kalır ve βγ kompleksi olarak fonksiyon görür. Hem aktif GTP-bağlı α alt birimi hem de βγ kompleksi bir hücre içi yanıt oluşturmak üzere hedefleri ile etkileşir. α alt biriminin aktivitesi bağlı GTP nin hidrolizi ile sonlandırılır ve o zaman inaktif α alt birimi (şimdi GDP ile bağlı) βγ kompleksi ile yeniden etkileşir, yeniden döngüye başlamak için hazırdır.

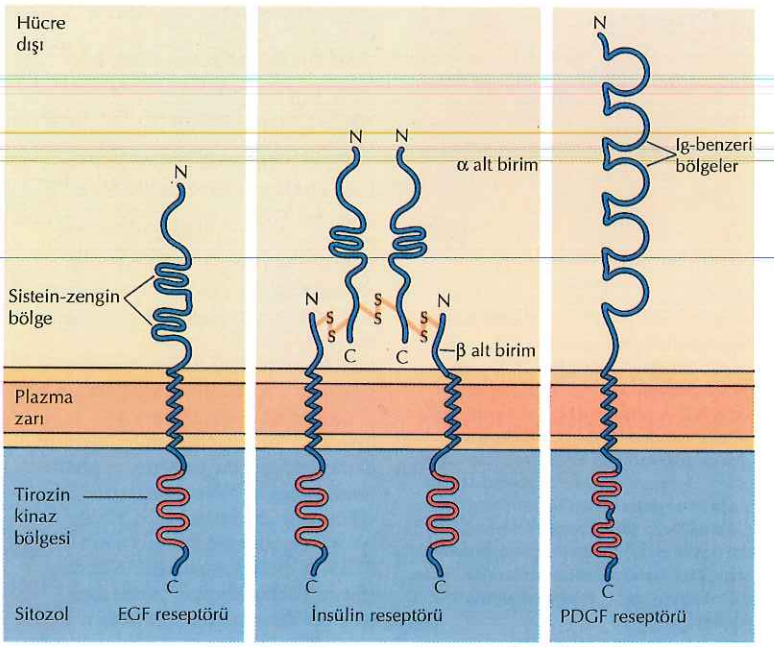
Memeli genomu en az 20 farklı α alt birimini, 6β alt birimini ve 11γ alt birimini kodlar. Farklı G proteinleri farklı reseptörle etkileşir, böylece bu G proteinleri grubu farklı hücre içi hedefleri olan reseptörler ile eşleşir. Örneğin epinefrin reseptörü ile birleşen G proteini α alt birimi, adenilil siklazı stimüle ettiği için G_s olarak adlandırılır (bkz. Şekil 13.11). Diğer G protein α ve βγ alt birimleri ise adenilil siklazı inhibe edici ya da diğer hedef enzimlerin aktivitelerini düzenleyici etki gösterirler.

Hedef enzimlerin düzenlenmesine ek olarak, bazı G proteinlerinin hem α hem de βγ alt birimleri doğrudan iyon kanallarını düzenlerler. Bu konuda iyi bir örnek bir nörotransmiter olan asetilkolinin kalp kası üzerindeki etkisidir. Bu etki sinir ve iskelet kası üzerindeki etkisinden tamamen farklıdır. Sinir ve iskelet kası hücrelerindeki nikotinik asetilkolin reseptörleri ligand kapılı iyon kanallarıdır (bkz. Şekil 12. 23). Kalp kası hücrelerinin G proteinleri ile birlikte çalışan farklı bir asetilkolin reseptörü vardır. Bu G proteini α alt birimi adenil siklazı inhibe ettiği için, G_i olarak tanımlanır. Buna ek olarak, G_i βγ alt birimleri doğrudan plazma zarındaki K^+ kanallarını açar, bunun da kalp kası kontraksiyonunu yavaşlatıcı etkisi vardır.

Reseptör Protein-Tirozin Kinazlar

G proteini-eşlikli çalışan reseptörlerin aksine, diğer hücre yüzey reseptörleri doğrudan hücre içi enzimlerle bağlantılıdır. Bu gibi enzim ile bağlantılı reseptörler arasında en geniş aile, sübstrat proteinlerini tirozin amino asidinden fosforilleyen **reseptör protein-tirozin kinazlar**'dır. Bu aile birçok polipeptid büyüme faktörünün reseptörlerini içermektedir. Bundan dolayı hayvan hücrelerinin büyüme ve farklılaşma kontrolü ile ilişkili sinyal iletimi molekülleri olarak, protein-tirozin fosforilasyonu özellikle çok iyi çalışılmıştır. Gerçekten de ilk protein-tirozin kinaz, 1980'de Tony Hunter ve Bartholomew Sefton tarafından, hayvan tümör viruslarının, özellikle Rous sarkoma virusunun onkojenik potansiyelleri çalışılırken keşfedilmiştir. O sırada, Stanley Cohen ve arkadaşları tarafından EGF reseptörünün bir tirozin kinaz olarak işlev gördüğü bulundu ve protein-tirozin fosforilasyonunun, büyüme faktörü uyarımına yanıt olan önemli bir sinyal iletimi mekanizması olduğu açıkça gösterildi.

İnsan genomu EGF, NGF, PDGF, insülin ve birçok diğer büyüme faktörlerinin reseptörlerini içeren 58 reseptör protein-tirozin kinazı kodlar. Bu reseptörlerin hepsi ortak bir yapısal organizasyonu paylaşır: Bir N-ucu hücre dışı ligand-bağlama bölgesi, bir tekli transmembran α heliks, ve protein-tirozin kinaz aktivitesi olan sitozoldeki bir C-ucu bölgesi (Şekil 13.13). Çoğu reseptör protein-tirozin kinaz tek bir polipeptid zinciri içerdiği halde, insülin reseptörü ve ilgili bazı reseptörler iki polipeptid zincirinden oluşan dimerlerdir. Bu reseptörlerin hücre dışındaki bölümleri ile ligandlarına (örn; büyüme faktörleri) bağlanmaları sitozoldeki kinaz bölgesini aktive eder, bu aktivasyon, hem reseptörün kendisinin hem de, büyüme faktörü bağlanmasıyla başlatılan sinyalleri ileten hücre içi hedef proteinler fosfatlanır.



Şekil 13.13 Reseptör protein-tirozin kinazların organizasyonu
Her reseptör, bir N-ucu hücre dışı bağlanma bölgesi, mebranı geçen bir α heliks ve sitozolde protein-tirozin kinaz aktivitesi olan bir C-ucu bölgesi içerir. Şekilde üç farklı alt aileden reseptör protein-tirozin kinazların yapısı görülmektedir. EGF reseptörü ve insülin reseptörlerlerinin her ikisinin de sisteinden zengin hücre dışı bölgeleri vardır, buna karşın PDGF reseptörünün hücre dışı bölgesinde Ig benzeri bölgeler vardır. PDGF reseptörünün kinaz bölgesi, çoğu diğer protein-tirozin kinazların katalitik bölgelerinde bulunanlardan farklı, yaklaşık yüz amino asidlik bir ara parça eklentisine sahiptir. İnsülin reseptörü iki çift polipeptid zincirinden (α ve β olarak tanımlanan) bir dimer oluşturması ile diğer reseptörlerden farklıdır.

ANAHTAR DENEY

Src Protein – Tirozin Kinaz

Transforming Gene Product of Rous Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine

Tony Hunter ve Barthalomew M. Sefton
Salk Institute, San Diago, CA,

Proceedings of the National Academy of Science, USA, 1980, Cilt 77, Sayfa 1311-1315

Tony Hunter

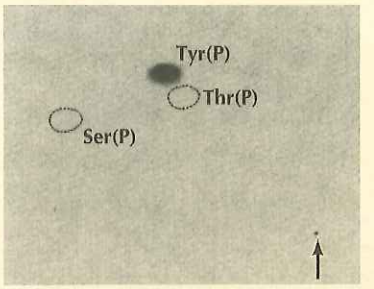
Bartholomew Sefton

Bağlam

Rous sarkom virusu (RSV), 1911'de izolasyonunu takiben hayvanlarda tümör oluşumuna neden olduğu genel kabul gören ilk virus olmuştur (bkz. Bölüm 1, Moleküler Tıp). RSV'nun birçok özelliği onu kanser gelişimi çalışmaları için çekici bir model yaptı. Özellikle RSV genomunun çok küçük boyda olması, kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan anormal hücre proliferasyonunun uyarımından sorumlu spesifik viral genlerin izolasyonu için bir umut ışığı oldu. Bu amaca 1970'de tümör oluşumunun uyarılması için gerekli tek bir RSV geninin (*sarkom*'dan gelen *src* denilen) ulaşıldı. İnsanın da dahil olduğu bir çok omurgalıda bu genle çok yakın akraba olan *src* geninin normal bir genetik eleman olduğu bulundu. Eğer viral Src proteini kanser hücrelerinde görülen kontrolsüz proliferasyonun sürdürülmesinden sorumlu protein ise, Src fonksiyonunun anlaşılması ile hem kanser oluşumunun, hem de normal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinin moleküler temelinin açıklanmasında çok önemli açılımlar elde edilecekti.

Ray Erikson ve arkadaşları 1977'de, RSV –ile uyarılmış hayvanlarda oluşan tümörlerden elde edilen antiserumlar ile çöktürme yoluyla Src proteinini tanımladılar (bkz. Şekil 3.30). Bundan kısa bir süre sonra Src immünopresipitanlarının radyoaktif işaretli ATP ile inkübasyonunun, immünglobulin molekülünün fosforile olması ile sonuçlandığı bulundu. Böylece Src ın bir protein kinaz olduğu ve hücre proliferasyonunun kontrolünde protein fosforilasyonunun rolü açıkça ortaya çıkarıldı.

Daha önce çalışılmış tüm protein kinazlar, hayvan hücrelerinde saptanmış tek fosfoamino asid olarak da bilinen serin veya treonin rezidülerinden fosforilleniyordu. Ancak, 1979'de Walter Eckhard ve Tony Hunter bir diğer hayvan virusundaki (poliomavirus) bir onkojenik proteinin tirozin üzerinden fosforillendiğini gözlemlediler. Hunter ve Seflon böylece Src'ın da kendi sübstratı olan proteini, serin/treonin yerine tirozinden fosforilleniyor olabeceğini incelediler. Deney sonuçları Src'ın bilinen bir protein-tirozin kinaz olarak fonksiyon gördüğünü gösterdi. Günümüzde bu aktivitenin hücre sinyal ileti yolaklarında merkezi rol oynadığı bilinmektedir.



Src ile fosfatlanan immünglobulinde fosfotirozinin belirlermesi.
RSV Src içeren immünopresipitant, [^{32}P] - ATP ile inkübe edildi. Daha sonra immünglobulin izole ve hidrolize edildi. Hidrolize edilen amino asidler elektroforez ve ince-tabaka selüloz plak üzerinde kromatografi ile ayrıldı. ^{32}P işaretli amino asidlerin pozisyonları plağın röntgen filmi (X ışını) ile karşılaştırılması ile belirlendi. Kesik çizgiler marker olarak kullanılmış işaretlenmemiş fosfoamino asidin pozisyonunu göstermektedir. ^{32}P ile işaretlenmiş amino asid fosfotirozindir.

Deneyler

Hunter ve Seflon ^{32}P işaretli ATP ile Src immün presipitantlarının inkübasyonu sonucunda Src tarafından forsforillenen amino asidi tanımladılar. Bu deneyde Src tarafından fosforillenen substrat proteindeki (bu deney için immünglobulin) amino asid radyoaktif olarak işaretlendi. Daha sonra tek tek amino asidlerin eldesi için immunglobulin izole ve hidrolize edildi, bu fosfotirozin, fosfoserin ve fosfotreoninin ayrımını sağlayan elektroforez veya kromatografi yöntemleri ile analiz edildi (şekle bakınız). Bu deneyde saptanan radyoaktif amino asid fosfotirozindi, bu da Src'ın spesifik olarak fosfotirozin rezidüsünden fosforillendiğini göstermektedir.

Daha sonraki immün presipitasyon deneyleri normal hücrelerdeki Src proteininin de, viral hücrelerdeki gibi protein-tirozin kinaz olarak fonksiyon gördüğünü gösterdi. Buna ek olarak, Hunter ve Seflon bu *in vitro* deneyleri genişleterek, tam hücrelerden elde edilen proteinlerde de fosfotirozinlerin bulunduğunu gösterdiler. Normal hücrelerde,

fosfotirozin, toplam fosfoamino asidlerin %0.03'ü kadardır (kalanı fosfoserin ve fosfozreonindir), bu da daha önce neden saptanamadığını açıklamaktadır. Ancak, fosfotirozinin RSV ile enfekte edilen hücrelerde on kat daha fazla olması, Src'ın anormal hücre proliferasyonunu uyarma yeteneğinden, viral Src proteinin protein-tirozin kinaz aktivisindeki artışın sorumlu olduğunu desteklemektedir.

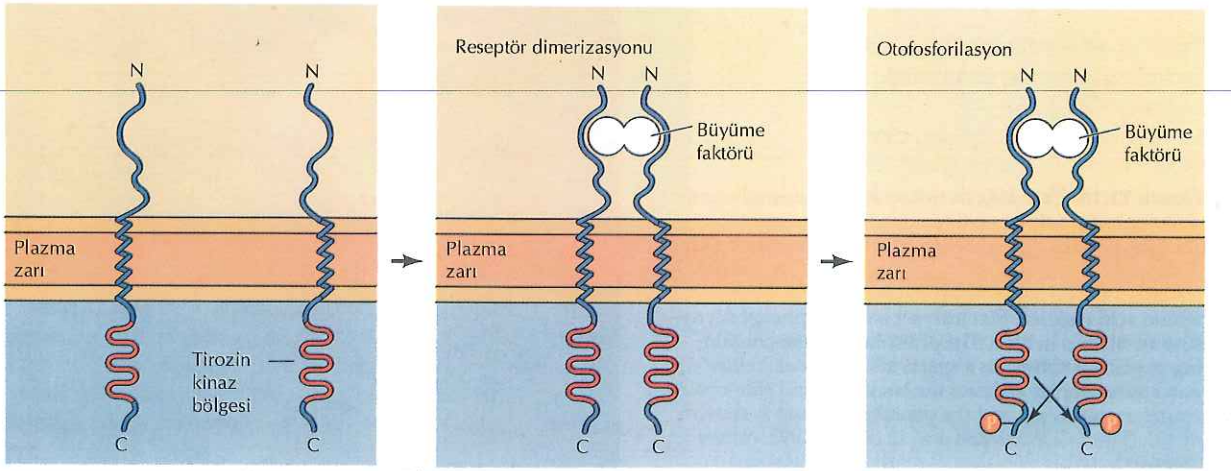
Etki

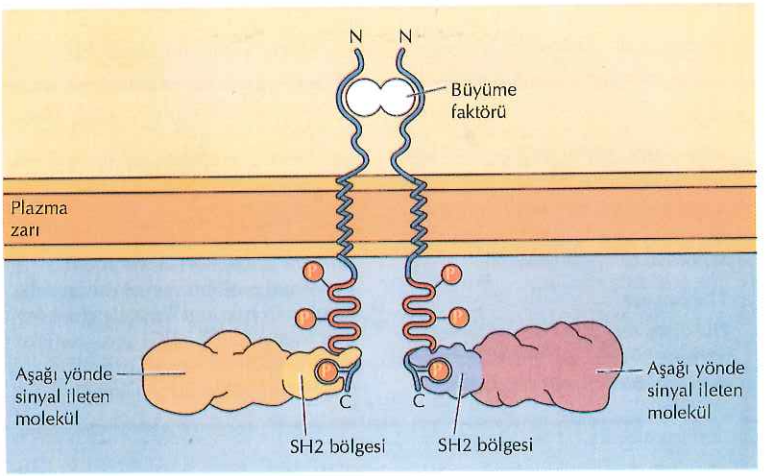
Src'ın bir protein kinaz olduğunun keşfedilmesi ile hem yeni protein tirozin kinaz aktivitesi hem de bu aktivitenin hücre proliferasyonunun kontrolü ile ilişkili olduğu tanımlandı. Hunter ve Seflon'un sonuçlarını takiben diğer tümör virus proteinlerinin de protein-tirozin kinazlar olarak işlev gördüklerinin gösterilmesi, protein-tirozin fosforilasyonu ile kanser hücrelerindeki anormal proliferasyon arasındaki ilişki genelleştirildi. Daha sonra Stanley Cohen ve arkadaşları, EGF reseptörünün de bir protein kinaz olduğunu buldu, bu, protein-tirozin kinaz fosforilasyonunun normal hücre çoğalmasının kontrolündeki rolünü direkt olarak gösterdi. Devam eden çalışmalar ile çok sayıda diğer reseptörün ve reseptör olmayan proteinlerin birçok farklı sinyal iletimi yolaklarında fonksiyon gördükleri belirlendi. Böylece tavuklarda kansere neden olan bir virusun etki mekanizmalarını belirleme çalışmaları, hayvan hücrelerinin büyüme, sağ kalım ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal ileti yolaklarının merkezinde, daha önceden tanımlanmamış bir enzimatik aktivitenin rolü olduğunu açığa çıkardı.

Çoğu reseptör protein-tirozin kinaz sinyal iletiminde, ilk basamak ligand tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonudur (Şekil 13.14). PDGF ve NGF gibi bazı büyüme faktörleri, kendileri, identik iki-polipeptid zincirinden oluşan dimerlerdir; bu büyüme faktörleri iki farklı reseptör molekülüne eş zamanlı olarak bağlanarak doğrudan dimerizasyonu uyarırlar. Diğer büyüme faktörleri (EGF gibi) monomerik moleküllerdir, fakat farklı reseptör polipeptidleri arasında protein-protein etkileşimlerini sağlayan konformasyonel değişiklikler uyarılması sonucunda reseptör dimerizasyonuna yol açarlar.

Ligand-tarafından uyarılan dimerizasyon daha sonra, dimerize polipeptid zincirlerinin birbirlerini karşılıklı fosforillemesi ile reseptörün **otofosforilasyonuna** neden olur (bkz. Şekil 13.14). Bu otofosforilasyon bu reseptörlerden sinyal iletiminde iki kilit rol oynar. İlk olarak, katalitik bölgedeki tirozinlerin fosforillenmesi protein kinaz aktivitesini artırır. İkincisi, katalitik bölge dışındaki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu hücre içi sinyalleri, aktif reseptörden, aşağı yöndeki moleküllere iletecek ek proteinler için özgün bağlanma bölgeleri yaratır.

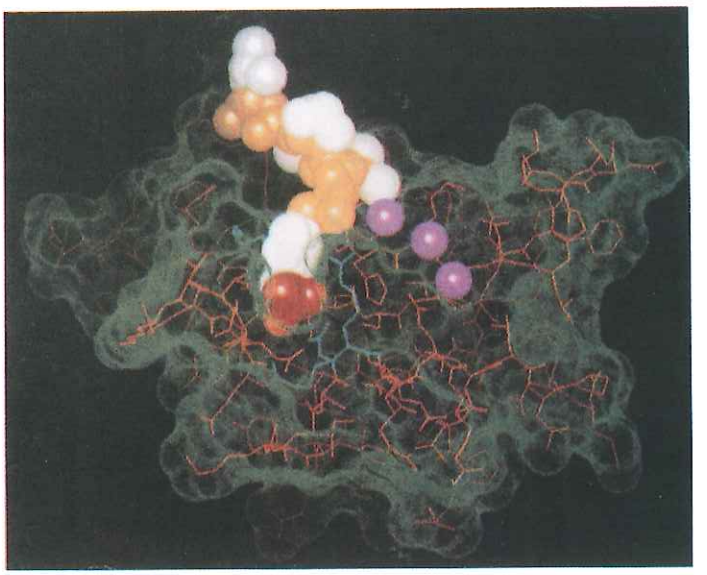
Şekil 13.14 Reseptör protein-tirozin kinazların dimerizasyonu ve otofosforilasyonu
Büyüme faktörünün bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve bu da iki polipeptid zincirinin karşılıklı olarak birbirlerini fosforillemesi olarak tanımlanabilen reseptör otofosforilasyonu ile sonuçlanır.





Şekil 13.15 Reseptör protein-tirozin kinazlar ile aşağı-yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin bağlanmaları
Aşağı yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin SH2 bölgeleri, aktive edilmiş reseptörlerin fosfotirozin içeren spesifik peptidlerine bağlanırlar.

Reseptör protein-tirozin kinazlar ile aşağı yöndeki sinyal ileti molekülleri arasındaki bu etkileşim, özgün fosfotirozin-içeren peptidlere bağlanan protein bölgeleri (domeyn) tarafından düzenlenir (Şekil 13.15). Tanımlanan bu bölgelerden birincisi, ilk kez Rous sarkoma virusundaki onkojenik bir protein olan Src ile ilintili bir protein-tirozin kinazda tanımlandığı için, **SH2 bölgesi** (*Src* homoloji 2) olarak adlandırılır. SH2 bölgeleri yaklaşık yüz amino asid uzunluğundadır ve fosfotirozin rezidüsü içeren özgün kısa peptid dizilere bağlanırlar (Şekil 13.16). Diğer proteinler, fosfotirozin içeren peptidlere **PTB bölgeleri** (fosfotirozin-bağlanma bölgeleri) aracılığı ile bağlanırlar. Aktif protein-tirozin kinazlar ile SH2- veya PTB- içeren peptidlerin etkileşimleri sonucunda birçok etki ortaya çıkabilir: bu proteinlerin plazma zarında yerleşiminin sağlanması, diğer proteinler ile etkileşimlerine öncülük etmesi, fosforilasyonlarını başlatması ve enzimatik aktivitelerini uyarması. Bu proteinlerin otofosforile reseptörler ile etkileşimi, böylece, büyüme faktörlerinin hücre yüzeyine bağlanması ile başlatılan sinyallerin hücre içine iletiminde ilk basmağı temsil eder.



Şekil 13.16 Bir SH2 bölgesi ve bir fosfotirozin peptid arasındaki bağlantı
Src SH2 bölgesinin polipeptid zinciri kırmızı ile, yüzeyi ise yeşil noktalarla gösterilmiştir. Mor daireler yüzeydeki oluğa karşılık gelmektedir. Fosfotirozin ile etkileşime giren üç amino asid rezidüsü ise mavi renkte gösterilmiştir. Fosfotirozin içeren peptid dolgu model ile gösterilmiştir. Sarı ve beyaz daireler sırasıyla iskeleti ve yan zincirdeki atomları temsil etmektedir, fosfat grubu ise kırmızı ile gösterilmiştir (G.Waksman ve 13 arkadaşı, 1992. *Nature* 358:646).

Sitokin Reseptörleri ve Reseptör Olmayan Protein-Tirozin Kinazlar

Birçok reseptör içsel enzimatik aktiviteye sahip olmadıkları halde, kovalent olmayan bağlar ile etkileşimde oldukları, hücre içi protein-tirozin kinazları uyararak etki gösterirler. **Sitokin reseptör süperailesi** olarak adlandırılan bu reseptör ailesinde, çoğu sitokin (örn., interlökin-2 ve eritropoietin) ve bazı polipeptid hormon reseptörleri yer alır. Sitokin reseptörleri de, reseptör protein-tirozin kinazlar gibi, N-ucu hücre dışı ligand-bağlama bölgesi, bir transmembran α heliks ve C-ucu sitozolik bölgesini içerir. Ancak, sitokin reseptörlerinin sitozolik bölgelerinin bilinen herhangi bir katalitik aktiviteleri yoktur. Bunun yerine, ligand bağlanması sonucunda aktive olan **reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar** ile etkileşime girerek işlev görürler.

Sitokin reseptörleri aracılıklı sinyal iletiminde birinci basamağın, ligand-tarafından uyarılan reseptör dimerizasyonu ve ilişkili olduğu reseptör olmayan protein-tirozin kinazların çapraz-fosforillenmesi olduğu düşünülmektedir (Şekil 13.17). Böylece, bu aktif kinazlar reseptörü fosforilleyebilir ve SH2 bölgesi içeren aşağı yöndeki sinyal iletimi moleküllerinin bir araya gelmesi için fosfotirozin-bağlanma bölgeleri oluşumunu sağlar. Bu nedenle sitokin reseptörlerinin ilişkili olduğu reseptör olmayan protein-tirozin kinazlarla birleşimi, bir önceki bölümde reseptör protein-tirozin kinazlar ile benzer işleve sahiptir.

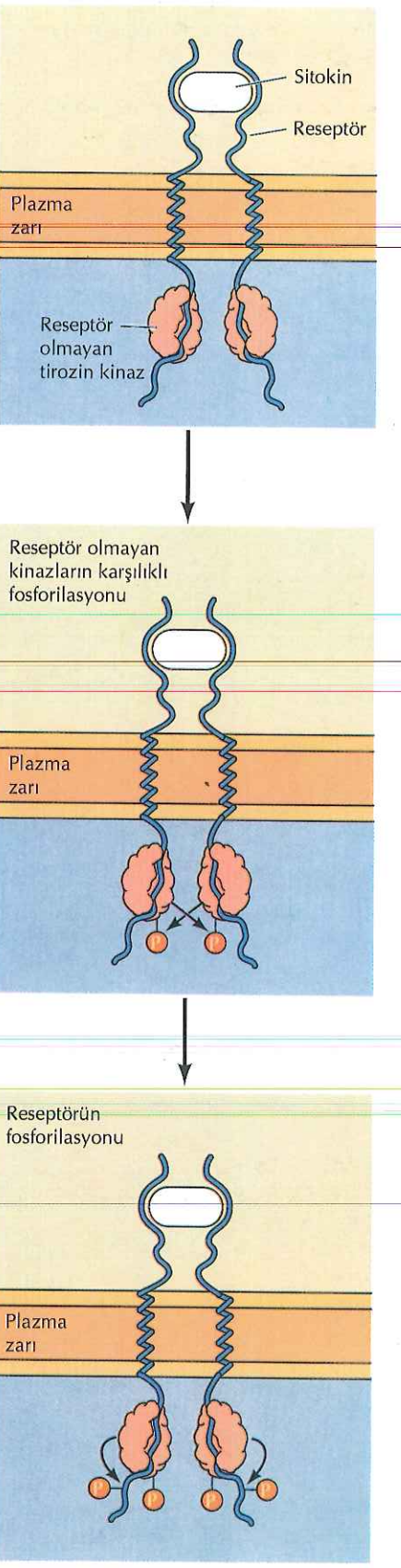
Sitokin reseptörleri ile birleşen bu kinazlar reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ile ilişkili dört üyeyi içeren **Janus kinaz**, ya da **JAK**, ailesi üyesidir. JAK ailesi üyelerinin, sitokin reseptörlerinden sinyal iletimi için genelde gerekli olduğunun ortaya çıkması, JAK ailesi kinazların, bu reseptörlerin tirozin fosforile hücre içi hedefler ile kenetlenmesinde çok önemli olduğunu göstermektedir.

Diğer reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar, Src ve sekiz adet yakın ilişkili proteini içeren, **Src** ailesi üyesidirler. Daha önce de belirtildiği gibi, Src ilk olarak Rous sarkoma virusunun onkojenik proteini olarak tanımlanmıştır ve protein-tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu gösterilen ilk proteindir. Bundan dolayı Src hücre sinyal iletiminin anlaşılmasında bugünkü aşamaya gelmemizi sağlayan deneylerin gerçekleştirilmesinde yaşamsal bir rol oynar. Src ailesi üyeleri, T ve B hücreleri üzerindeki antijen reseptörlerinden ve (bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi) hücre tutunma bölgelerinde yer alan integrinlerden hücre dışı matrise, reseptör protein-tirozin kinazların aşağı yönündeki sinyal iletiminde anahtar roller oynarlar.

Diğer Enzimatik Aktivitelerle Bağlantılı Reseptörler

Enzim-bağlantılı reseptörlerin büyük bir çoğunluğu protein-tirozin fosforilasyonunu uyarıyor olsa da, bazı reseptörler diğer enzimatik aktiviteler ile ilişkilidir. Bu reseptörler; protein-tirozin fosfatazları, protein-serin /treonin kinazları ve guanilil siklazları içerir.

Protein-tirozin fosfatazlar fosfotirozin rezidülerinden fosfat gruplarını uzaklaştırır, bu nedenle protein tirozin kinazların etkisini dengeleyici olarak davranırlar. Çoğu durumda, protein-tirozin



Şekil 13.17 Sitokin reseptörlerinden sinyal iletimi
Ligand bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve karşılıklı-fosforillenme sonucunda, bağlantılı bulunduğu reseptör olmayan protein-tirozin kinazların aktivasyonunu sağlar. Böylece aktive olan kinazlar reseptörü tirozin rezidülerinden fosforilleyerek, aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri için fosfotirozin bağlanma bölgeleri yaratırlar.

fosfatazlar, hücre sinyal ileti yolaklarında, protein-tirozin kinazlar tarafından başlatılan sinyalleri sonlandırarak, negatif düzenleyici rolü oynarlar. Ancak bazı protein-tirozin fosfatazlar, enzimatik aktiviteleri hücre sinyal iletiminde pozitif bir rol oynayan hücre yüzey reseptörleridir. T ve B lenfositlerin yüzeyinde eksprese edilen ve CD45 olarak adlandırılan bir reseptör buna iyi bir örnektir. Antijen uyarımı sonrasında, CD45, Src ailesi üyelerinin enzimatik aktivitelerini inhibe eden, özgül bir fosfotirozinden fosfat grubunu uzaklaştırır. Böylece, CD45 protein-tirozin fosfataz, biraz ters bir şekilde, reseptör olmayan protein-tirozin kinazları uyarıcı etki yapar.

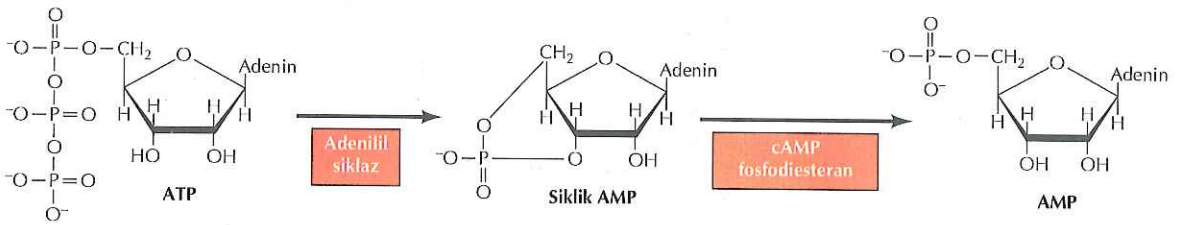
Transforme edici büyüme faktörü β (TGFβ) reseptörleri ve ilişkili polipeptidler, sübstratları olan proteinleri tirozinden değil, serin ya da treoninden fosforilleyen protein kinazlardır. TGFβ, birçok çeşitli hücre tipinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden, genellikle hedef hücrelerindeki proliferasyonu baskılayan bir polipeptid büyüme faktörü ailesininin en tipik örneğidir. TGF-β ailesinin bir üyesinin reseptörünün 1991'de ilk kez klonlanması, sitozolde **protein-serin/treonin kinaz** domeynine sahip, yeni bir reseptör ailesnin prototipi olduğunu gösterdi. O zamandan beri, diğer TGFβ aile üyelerinin reseptörlerinde de, benzer protein-serin/treonin kinazlar olduğu bulundu. Ligandların bu reseptörlere bağlanması, TGFβ reseptör ailesinin farklı üyeleri tarafından kodlanan iki farklı tipteki polipeptid zincirinin etkileşimi ve reseptör kinazların karşılıklı olarak birbirlerini fosforilleyen heterodimerlerinin oluşumu ile sonuçlanır. Böylece, aktive TGFβ reseptörleri SMAD'ler olarak adlandırılan, nükleusa geçerek hedef genlerin ekspresyonunu uyaran, bir transkripsiyon faktörü ailesinin üyelerini fosfatlar.

Bazı peptid ligandlar sitozolik bölgeleri siklik GMP oluşumunu katalizleyen guanilil siklazlar olan reseptörlerine bağlanır. Daha önce de tartışıldığı gibi, nitrik oksid de guanil siklaz uyarımı yaparak etki gösterir, fakat nitrik oksidin hedefi hücre içi enzimlerden çok, transmembran reseptörlerdir. Reseptör guanilil siklazların; hücre dışı ligand-bağlama bölgeleri, bir transmembran α heliksleri ve katalitik aktivitesi olan bir sitozolik bölgeleri vardır. Ligand bağlanması siklaz aktivitesini uyarır, bu da, hücre-içi etkileri bu bölümde daha sonraki kısımlarda tartışılacak bir ikinci mesajcı olan, siklik GMPnin oluşumuna yol açar.

Diğer reseptörler, ek biyokimyasal aktiviteleri olan sitoplazmik proteinlere bağlanırlar. Örneğin, sitokin tümör nekroz faktörü (TNF) hücre ölümünü uyarır, belki de (bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi), bu dokulardaki hasarlanmış ya da istenmeyen hücrelerin elenmesinin bir yoludur. TNF reseptörleri ve ilişkili ölüm-sinyal iletimi molekülleri ligand bağlanmasına yanıt olarak aktive olan spesifik proteazlar ile birleşirler. Bu reseptör-bağlantılı proteazların aktivasyonu sonuçta birçok farklı hücre içi proteinin yıkımına ve hücre ölümüne yol açan, aşağı yöndeki diğer proteazların aktivasyonunu tetikler.

Hücre-içi Sinyal İleti Yolakları

Hücre-içi hedef enzimleri uyaran, çoğu hücre yüzey reseptörü, doğrudan ya da dolaylı olarak G proteinleri ile birlikte çalışırlar. Bu hücre-içi enzimler, ligand bağlanması ile başlayan sinyalleri yayan ya da amplifiye eden aşağı yöndeki sinyal iletimi elemanları olarak iş görürler. Çoğu durumda, bir reaksiyonlar zinciri, sinyalleri hücre yüzeyinden çok çeşitli hücre-içi hedeflere iletir, bu sürece **hücre-içi sinyal iletimi** denir. Bu gibi sinyal ileti yolaklarının hedefleri sıklıkla



Şekil 13.18 cAMP'nin sentezi ve yıkımı
Siklik AMP adenilil siklaz tarafından ATP den sentezlenir ve cAMP fosfodiesteraz ile AMP ye yıkılır.

gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Böylece, hücre-içi sinyal ileti yolakları hücre yüzeyini çekirdeğe bağlar. Bu bağlantı hücre-dışı uyarılara yanıt olarak gen ekspresyonu değişikliklerine yol açar.

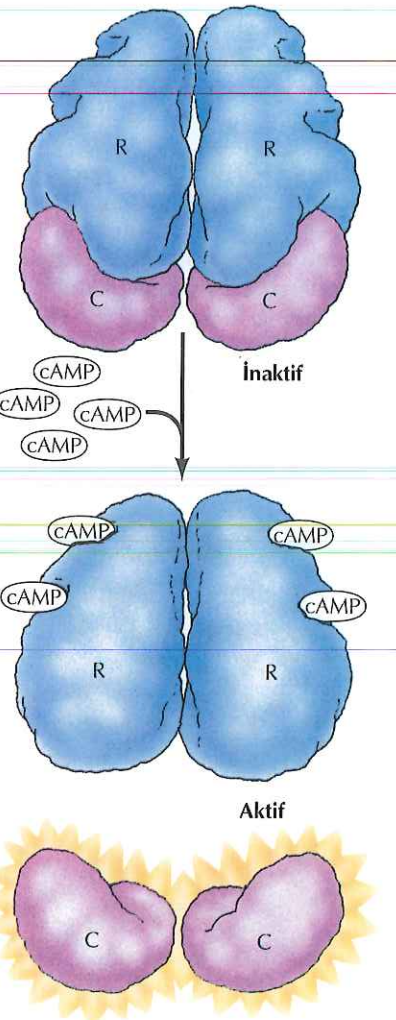
cAMP Yolağı: İkinci Mesajcılar ve Protein Fosforilasyonu

Hücre-içi sinyal iletimi ilk olarak, kas aktivitesinin uyarılmasında glikojenden glukoza yıkım sinyallerini sağlayan epinefrin gibi hormonların etkilerini belirlemeyi amaçlayan çalışmalar ile tanımlanmıştır. Earl Sutherland 1958'de, epinefrinin etkisinin hücre-içi **siklik AMP (cAMP)** konsantrasyonundaki artış ile düzenlendiğini keşfetti, bu keşif cAMP nin hormonal sinyal iletiminde (hormonun kendisi birinci mesajcıdır) bir **ikinci mesajcı** kavramının oluşumuna öncülük etti. Siklik AMP **adenilil siklaz** etkisi ile ATP den oluşur ve **cAMP fosfodiesteraz** tarafından AMP ye parçalanır (Şekil 13.18). Daha önce de belirtildiği gibi, epinefrin reseptörü enzimatik aktivitesini uyaracak bir G proteini aracılığıyla adenilil siklaz ile eşleşir, böylece hücre içi cAMP konsantrasyonu artar (bkz. Şekil 13.11).

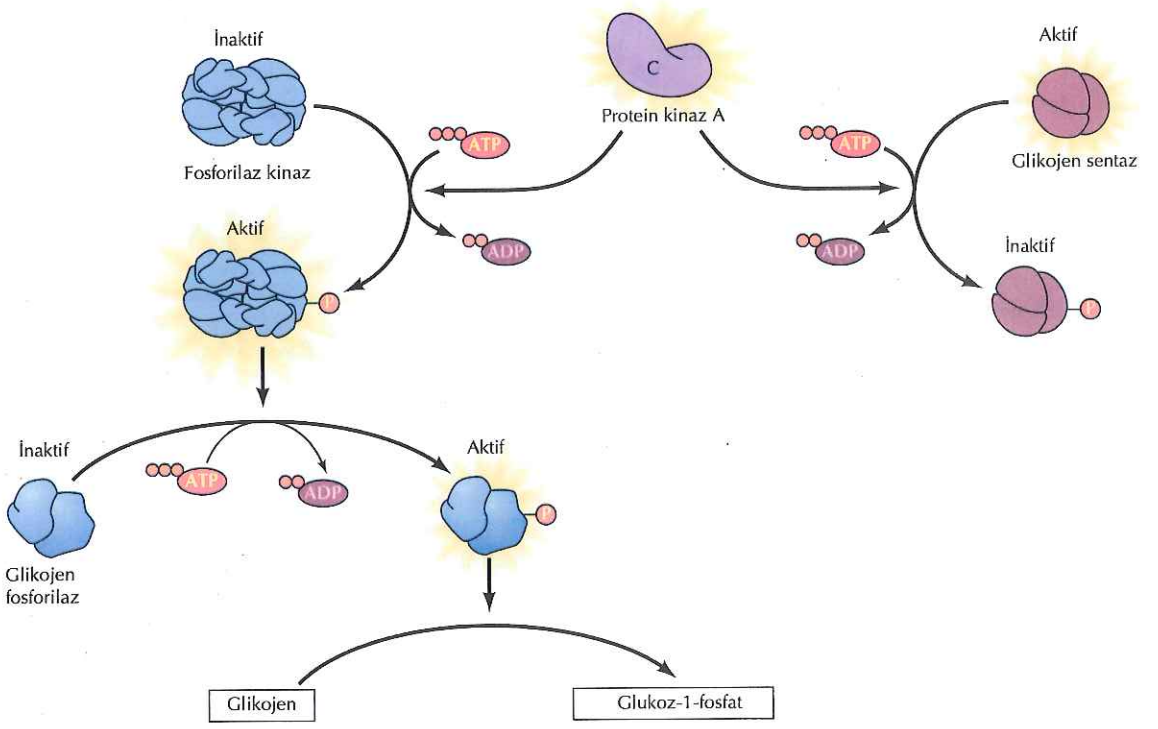
Sonra cAMP glikojen yıkımını nasıl uyarıyor? cAMP'nin hayvan hücrelerindeki bu ve çoğu diğer etkileri 1968'de Donal Walsh ve Ed Krebs tarafından keşfedilen bir enzim olan, **cAMP-bağımlı protein kinaz**, ya da **protein kinaz A** etkisi ile düzenlenir. Protein kinaz A'nın inaktif formu iki katalitik ve iki düzenleyici alt birimden oluşan bir tetramerdir (Şekil 13.19). Siklik AMP'nin düzenleyici alt birime bağlanması katalitik alt birimden ayrılmasını yol açar. Böylece, serbest katalitik alt ünite enzimatik olarak aktif olur ve hedef proteinlerini serin rezidüsünden fosforilleyebilir.

Glikojen metabolizmasının düzenlenmesinde protein kinaz A, iki hedef enzimi fosforiller (Şekil 13.20). Bunlardan birincisi, protein kinaz A tarafından fosforillenen ve aktive edilen bir diğer protein kinaz olan fosforilaz kinazdır. Fosforilaz kinaz fosforile olduğu zaman glikojenin glukoz-1-fosfata yıkımını katalizleyen glikojen fosforilazı aktive eder. Buna ek olarak protein kinaz A, glikojen sentezini katalize eden bir enzim olan glikojen sentaz enzimini de fosforiller. Bu durumda fosforilasyon enzimatik aktiviteyi inhibe eder. cAMP düzeyinin yükselmesi ve protein kinaz A aktivasyonu, böylece, daha fazla glikojen sentezini bloklar, aynı zamanda glikojen yıkımını uyarır.

Epinefrin reseptöründen, glikojen fosforilaza doğru ilerleyen reaksiyonlar zinciri, hücre-içi sinyal iletimi sırasındaki sinyal



Şekil 13.19 Protein kinaz A'nın düzenlenmesi
Protein kinaz A'nın inaktif formu iki düzenleyici (R) ve iki katalitik (C) alt birim içerir. cAMP'nin düzenleyici alt birime bağlanması katalitik birimin ayrılmasına ve enzimatik olarak aktif hale geçmesine neden olan bir konformasyon değişikliğini uyarır.

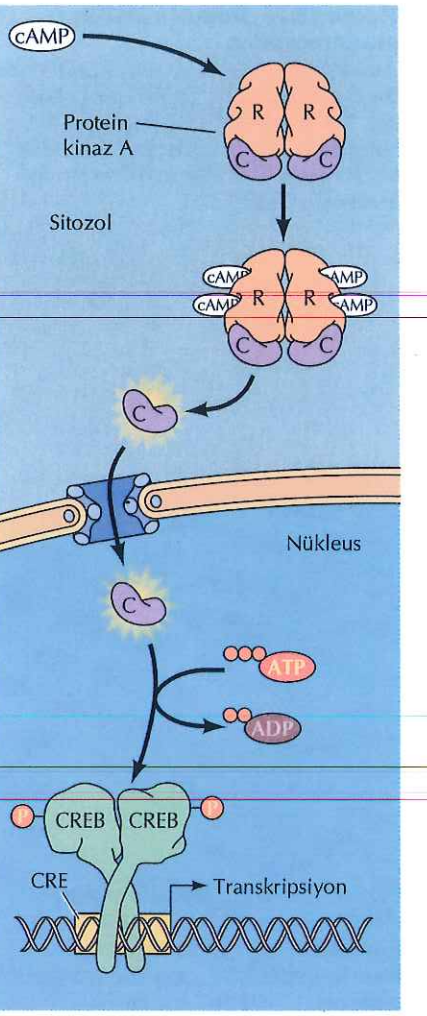


Şekil 13.20 Protein kinaz A ile glikojen metabolizmasının düzenlenmesi
Protein kinaz A hem glikojen sentazı, hem de fosforilaz kinazı fosforiller. Glikojen sentaz (glikojen sentezini katalizler) bu fosforilasyon ile inhibe olurken fosforilaz kinaz aktive olur. Fosforilaz kinaz fosforillendiği zaman glikojen fosforilazı aktive eder, bu da glikojenin glukoz-1-fosfata yıkılmasını katalizler.

amplifikasyonuna iyi bir örnek oluşturur. Her bir molekül epinefrin yalnızca bir tek reseptörü aktive eder. Ancak, her reseptör yüz moleküle kadar G_s aktive edebilir. Bu durumda her molekül G_s, birçok cAMP molekülü sentezini katalize edebilecek olan bir adenil siklazın enzimatik aktivitesini uyarır. Sinyal amplifikasyonu her bir protein kinaz A molekülünün birçok fosforilaz kinaz molekülünü fosforillemesi ile devam eder. Her bir fosforilaz kinaz da, birçok glikojen fosforilaz molekülünü fosforiller. Bu şekilde hormonların çok az sayıda reseptöre bağlanması çok daha fazla sayıda hücre-içi hedef enzimin aktivasyonuna yol açar.

cAMP artışı çoğu hayvan hücresinde **cAMP yanıt elemanı** ya da CRE olarak adlandırılan bir düzenleyici diziyi içeren, özgün hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 13.21). Bu durumda sinyal, protein kinaz A'nın düzenleyici biriminin ayrılması sonrasında nükleusa girebilen katalitik alt birimi tarafından, sitoplazmadan çekirdeğe taşınır. Nükleus içinde, protein kinaz A, **CREB** (CRE-bağlanan protein) olarak adlandırılan ve c-AMP-tarafından uyarılan genlerin aktivasyonunu sağlayan bir transkripsiyon faktörünü fosforiller. cAMP tarafından gen ekspresyonunun bu şekilde düzenlenmesi, çok çeşitli hayvan hücrelerin proliferasyon, sağ kalım ve farklılaşmalarının kontrolünde önemli roller oynarlar.

Protein kinaz A gibi protein kinazların hücre içinde bağımsız işlev görmediklerini bilmek önemlidir. Bunun aksine, protein fosforilasyonu, protein fosfatazların etkisiyle hızla geri dönüştürülebilir. Daha önceki bölümde de belirtildiği gibi, bazı protein fosfatazlar transmembran reseptörlerdir. Bir bölümü, sübstratları olan proteinlerdeki fosforile tirozin ya da serin/treonin rezidülerinden fosfat grubunu uzaklaştıran sitozol enzimleridir. Bu protein fosfatazlar



Şekil 13.21 Siklik AMP ile uyarılabilen gen ekspresyonu
Protein kinaz A nın serbest katalitik alt birimi çekirdeğe geçer ve transkripsiyon faktörü CREB (CRE-bağlanan protein)i fosforiller, bu da cAMP tarafından uyarılan genlerin ekspresyonunu sağlar.

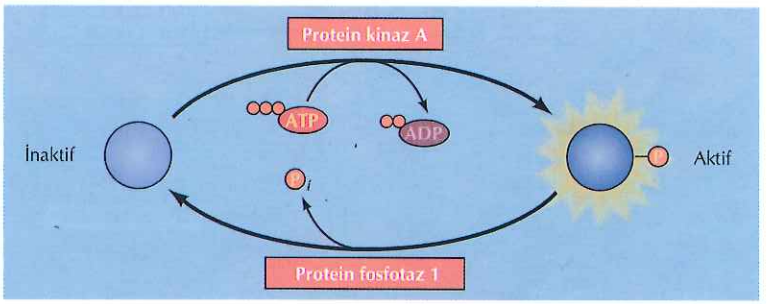
protein kinazların, reseptör aktivasyonu ile başlatılan etkilerini sonlandırıcı görev yaparlar. Örneğin, protein kinaz A tarafından serin rezidüsünden fosforillenen bir protein, genellikle protein fosfataz 1 olarak adlandırılan bir fosfatazın etkisi ile defosforile edilir (Şekil 13.22). Bu nedenle, protein kinaz A sübstratlarının (fosforilaz kinaz ve CREB gibi) fosforilasyon düzeyleri, hücre içi protein kinaz A ve protein fosfataz aktiviteleri arasındaki denge ile belirlenir.

Her ne kadar cAMP çoğu etkisi çoğunlukla protin kinaz A aracılığıyla düzenleniyor olsa da, cAMP iyon kanallarını protein fosforilasyonundan bağımsız olarak doğrudan denetleyebilir. İkinci mesajcı olarak cAMP nin bu işlevi, koku duyusu ile ilişkilidir. Burundaki duyusal sinirlerdeki koku reseptörlerinin çoğu G-proteinleri ile birlikte çalışan ve adenilil siklazı uyararak hücre-içi cAMP düzeyindeki artışa yol açan reseptörlerdir. Bu sistemde cAMP Protein kinaz A'yı uyarmaktan çok, doğrudan plazma zarındaki Na^+ kanallarını açar, bu da zar depolarizasyonuna ve sinir uyarımının başlatılmasına yol açar.

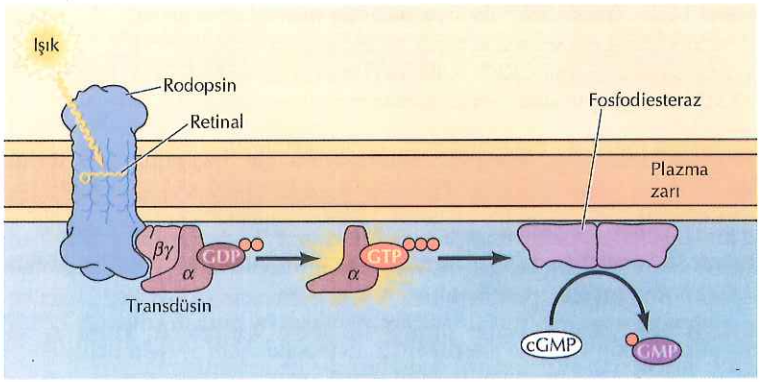
Siklik GMP

Henüz görevleri cAMP kadar iyi tanımlanmış olmasa da, hayvan hücreleri için önemli bir diğer ikinci mesajcı da **Siklik GMP (cGMP)** dir. Siklik GMP guanilil siklaz tarafından GTP den oluşturulur ve bir fosfodiesteraz tarafından GMP'ye parçalanır. Bu bölümde daha önce de tartışıldığı gibi, guanilil siklazlar, peptid ligandlar kadar nitrik oksid ve karbon monoksit tarafından da aktive edilir. Guanilil siklazların uyarımı cGMP düzeyinin yükselmesine yol açar, bu da kan damarlarının genişlemesi gibi biyolojik yanıtları düzenler. Her ne kadar cGMP iyon kanallarını ve başka hedefleri de düzenleyici rol oynayabiliyorsa da, etkisi sıklıkla cGMP-bağımlı protein kinaz aktivasyonu ile düzenlenir.

cGMP nin en iyi tanımlanmış rolü omurgalıların gözündedir, burada cGMP, ışık gibi, alınan görsel sinyallerin sinir uyarılarına çeviriminden sorumlu bir ikinci mesajcı olarak görev yapar. Retina çubuk hücrelerindeki fotoreseptör, **rodopsin** olarak adlandırılan bir G proteini- eşlikli reseptördür (Şekil 13.23). Rodopsin, ışığı absorblayarak all-*trans*-retinale dönüşen, yapısına bağlı küçük



Şekil 13.22 Protein kinaz A ve protein fosfataz 1 ile protein fosforilasyonunun düzenlenmesi
Hedef proteinlerin protein kinaz A tarafından fosforillenmesi, protein fosfataz 1 in etkisi ile geri dönüştürülür.

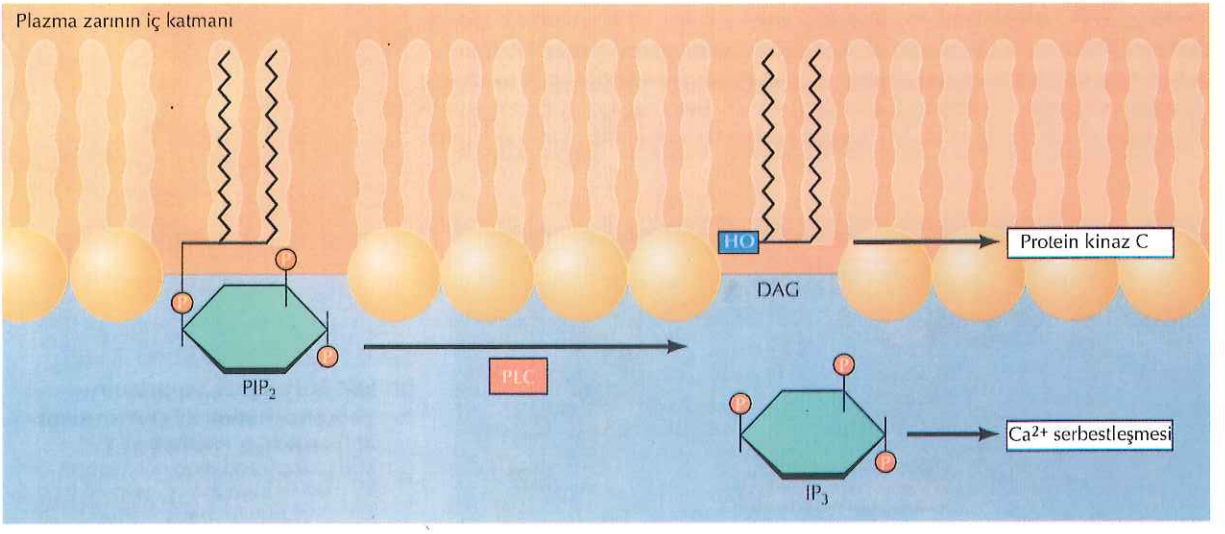


Şekil 13.23 Işığın algılanmasında Siklik cGMP'nin rolü
Işığın retinal tarafından emilmesi G proteni- eşlikli bir reseptör olan rodopsini aktive eder. Bu durumda transdüsinin alfa alt birimi cGMP fosfodiesterazı uyarır, bu da hücre içi cGMP düzeyinin azalmasını sağlar.

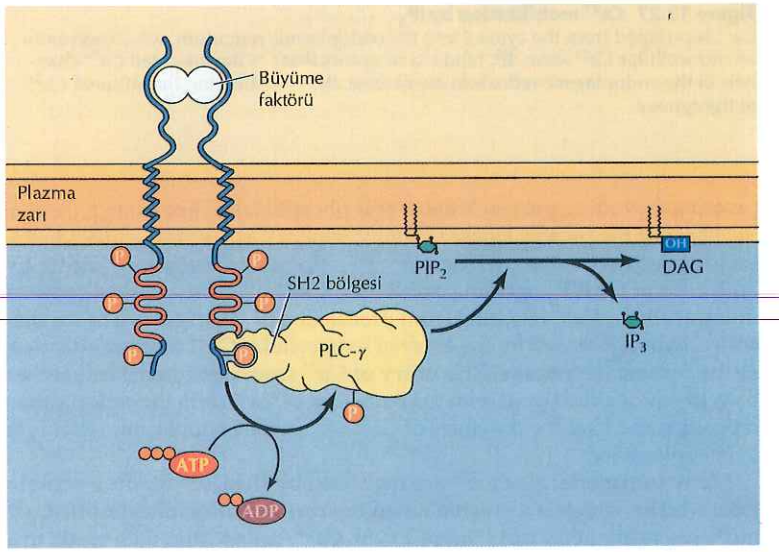
molekül 11-cis-retinal tarafından aktiflenir ve yapısal değişikliğe uğrar. Bu durumda rodopsin bir G proteini olan **transdüsin**'i aktive eder, transdüsinin α alt birimi hücre-içi cGMP düzeyinin azalmasına yol açan **cGMP fosfodiesteraz** aktivitesini uyarır. Retina çubuk hücrelerindeki cGMP düzeyindeki bu değişim, cAMP'nin kokuları algılamadaki etkisine benzer bir şekilde, cGMP nin plazma zarındaki iyon kanalları üzerine doğrudan etkisi ile, bir sinir uyarısına dönüştürülür.

Fosfolipidler ve Ca^{2+}

Hücre içi sinyal iletiminde en yaygın görülen yolaklardan birisi, bir zar fosfolipidi olan **fosfatidil inozitol 4,5- bisfosfat** (PIP_2) dan köken alan ikinci mesajcıların kullanımı esasına dayanır. PIP_2, plazma zarındaki çift tabaka fosfolipidlerin iç bölümünde yerleşmiş olan az rastlanan elemanlarından birisidir (bkz. Şekil 12.2). Çok farklı hormonlar ve büyüme faktörleri **fosfolipaz C** tarafından PIP_2 hidrolizini uyarırlar. Bu reaksiyon sonucunda iki farklı ikinci mesajcı oluşur, **diaçilgliserol** ve **inozitol 1,4,5-trifosfat** (IP_3) (Şekil 13.24). Diaçilgliserol ve IP_3, aşağı yöndeki farklı sinyal iletimi yolaklarını (sırasıyla protein kinaz C ve Ca^{2+} hareketi) uyarır, bundan dolayı PIP_2 hidrolizi hücre-içi sinyal iletiminde iki-kollu bir yolağı tetikler.



Şekil 13.24 PIP_2 nin hidrolizi
Fosfolipaz C (PLC)'nin fosfatitil inositol 4,5-bisfosfatın (PIP_2) hidrolizini katalizlemesi sonucunda diaçilgliserol (DAG) ve inositoltrifosfat (IP_3) elde edilir. Diaçilgliserol protein kinaz C ailesi üyelerini aktive eder ve IP_3 hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını sağlayan sinyallerini iletir.

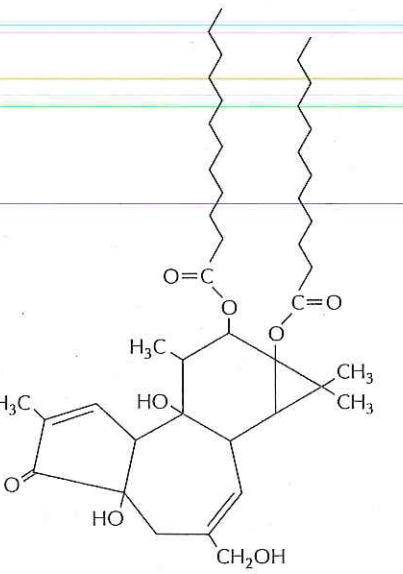


Şekil 13.25 Fosfolipaz C'nin protein-tirozin kinazlar ile aktivasyonu
Fosfolipaz C-γ (PLC-γ) aktive edilmiş reseptör protein-tirozin kinazlara SH2 bölgesi aracılığı ile bağlanır. Tirozin fosforilasyonu PLC-γ nın aktivitesini artırır, bu da PIP_2 hidrolizini uyarır.

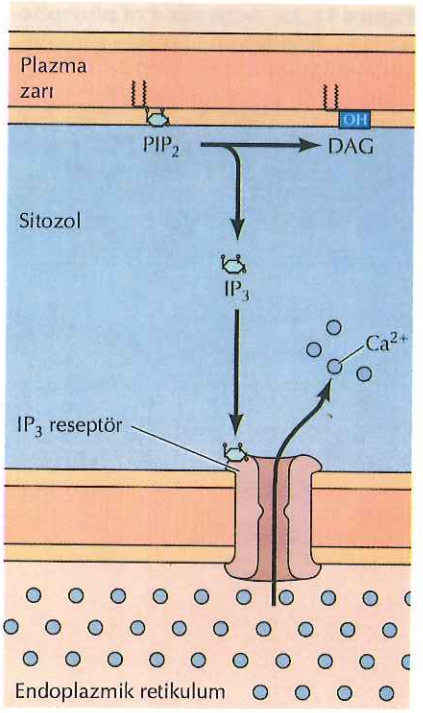
PIP_2 hidrolizinin, G protein-eşlikli reseptörlerin ve protein-tirozin kinazların her ikisinin de aşağı yönde aktive edilmesi dikkate değer bu fosfolipaz C'nin bir tipinin (PLC-β) G proteinleri tarafından uyarılırken, diğer bir tipinin (PLC-γ) aktif reseptör protein-tirozin kinazlar ile bağlanmasını düzenleyen SH2 bölgeleri içermesi sayesinde gerçekleşir (Şekil 13.25). Bu etkileşim PLC-γ'nın plazma zarına yerleşmesine, aynı zamanda katalitik aktivitesini artıran tirozin fosforilasyonuna yol açar.

PIP_2 hidrolizi ile üretilen diaçilgliserol ürünleri, **protein kinaz C** ailesinde yer alan, hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde önemli roller oynayan, protein-serin/treonin kinazları aktive eder. **Forbol esterlerinin** etkisi, protein kinaz C'nin bu rolünü gösteren iyi bir örnektir (Şekil 13.26). Bu konu deney hayvanlarında tümör gelişimini uyardığı için çok ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. Forbol esterlerinin bu tümör gelişimini uyarıcı aktivitesi, diaçilgliserol analoğu olarak etki göstererek protein kinaz C'yi uyarma yeteneği olması temeline dayanır. Bu durumda protein kinaz C, transkripsiyon faktörlerini kapsayan diğer hücre-içi hedefleri aktive ederek, gen ekspresyonunun değişmesine ve hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olur.

Diaçigliserol plazma zarına bağlı kalırken, PIP_2 kesimi ile oluşan ve sitozole salınan küçük bir polar molekül olan, bir diğer ikinci mesajcı, IP_3, hücre içi depolardan Ca^{2+} salınım sinyalleri oluşturur (Şekil 13.27). Bölüm 12'de de belirtildiği gibi, Ca^{2+} un hücreden dışarıya Ca^{2+} pompaları aracılığıyla aktif olarak atılımı sonucunda, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu çok düşük düzeyde tutulur (0.1 μM kadar). IP_3 ligand-kapılı Ca^{2+} kanallarına bağlanarak endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını sağlar. Sonuç olarak, sitozoldeki Ca^{2+} düzeyi 1μM'a kadar artması protein kinaz ve fosfatazları da içeren çok sayıda farklı hedef proteinin aktivitesini etkiler. Örneğin, protein kinaz C ailesinin bazı üyelerinin aktivasyonu için Ca^{2+} da diaçilgliserol kadar gereklidir,



Şekil 13.26 Bir forbol esterinin yapısı
Forbol esterleri, diaçilgliserol analoğu olarak etki göstererek protein kinaz C'yi uyarır.

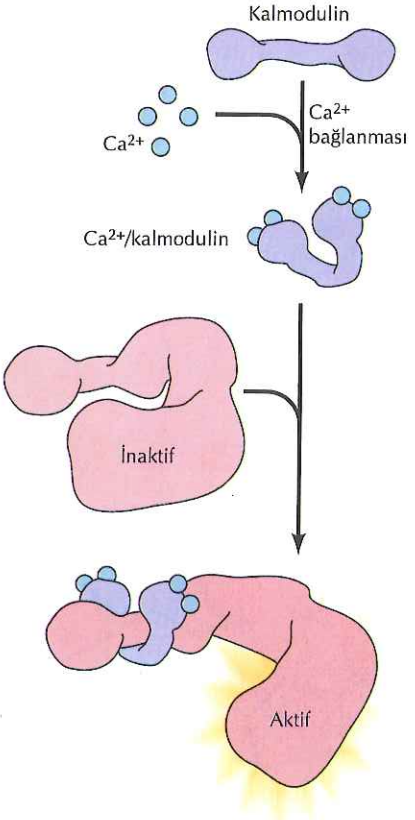


Şekil 13.27 Ca^{2+}'un IP^3 ile serbestleşmesi
Ca^{2+} sitozolde bir hücre içi Ca^{2+} deposu olan endoplazmik retikulumdan pompalanır. IP_3 ün endoplazmik retikulum zarındaki ligand kapılı Ca^{2+} kanalları olan Ca^{2+} reseptörlerine bağlanması sitozole Ca^{2+} çıkışını sağlar.

bu yüzden bu protein kinazlar PIP_2 sinyal ileti yolağının her iki kolu tarafından ortaklaşa düzenlenir. Çoğu hücrede, IP_3 üretimi sonucunda hücre-içindeki Ca^{2+} un geçici artışı, plazma zarındaki kanallar yoluyla hücre-dışındaki Ca^{2+} un içeriye girmesine neden olarak, daha uzun süreli artışı tetikler. Hücre dışından Ca^{2+} un girişi, hem endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımı ile başlatılan sinyallerin uzamasını, hem de endoplazmik retikulumdaki Ca^{2+} depolarının yenilenmesini sağlar.

Ca^{2+} un birçok etkisi Ca^{2+}-bağlayan bir protein olan **kalmodulin** tarafından düzenlenir. Kalmodulin, sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonu 0.5 μM'a kadar arttığı zaman aktive olur (Şekil 13.28). Bu durumda Ca^{2+}/kalmodulin protein kinazları da içeren çok farklı hedef proteine bağlanır. Miyozinin hafif zincirlerinden birisinin fosforillenmesi ile aktin-miyozin kasılması sinyallerini sağlayan miyozin hafif-zincir kinaz bu gibi Ca^{2+}/kalmodulin-bağımlı protein kinazlara bir örnektir (bkz. Şekil 11.29). Ca^{2+}/kalmodulin ile aktive edilen diğer protein kinazlar arasında, metabolik enzimleri, iyon kanallarını ve transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok farklı proteini fosforilleyen **CaM kinaz** ailesi de yer alır. CaM kinazın nörotransmiterlerin sentezi ve salınımını düzenleyen bir tipi özellikle sinir sisteminde yaygındır. Ek olarak, CaM kinazlar transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen ekspresyonunun düzenleyebilir. CaM kinaz tarafından fosforillenen transkripsiyon faktörlerinden birisinin, protein kinaz A tarafından aynı bölgeden fosforillenen CREB olması ilgi çekicidir. CREB'in bu fosforilasyonu Ca^{2+} ve cAMP sinyal ileti yolakları arasında birçok kesişme olduğunu gösterir. Bu konudaki diğer örnekler; adenilil siklaz ve fosfodiesterazların Ca^{2+}/kalmodulin tarafından fosforillenmesi, Ca^{2+} kanallarının cAMP aracılığı ile düzenlenmesi ve çok sayıdaki hedef proteinin hem protein kinaz A, hem de Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı protein kinaz tarafından fosforillenmesidir. Bu yüzden birçok hücresel yanıtın düzenlenmesinde cAMP ve Ca^{2+} sinyal ileti yolakları koordine olarak çalışır.

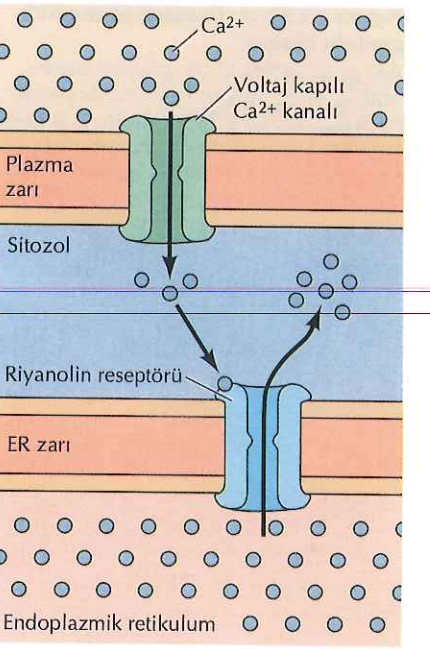
Hücre-dışı Ca^{2+} un girişi sinir ve kas gibi elektriksel olarak uyarılabilir hücreler için özellikle önemlidir. Bu hücrelerdeki voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları, zar depolarizasyonu ile açılır (Şekil 13.29). Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artması sonucunda **riyanodin reseptörleri** olarak bilinen farklı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonu ile, hücre-içi depolardan daha da fazla Ca^{2+} salınımı tetiklenir. Nöronlarda, hücre-içindeki Ca^{2+} konsantrasyonundaki artışın bir etkisi nörotransmiterlerin salınımıdır, bu nedenle Ca^{2+} sinir sisteminde elektriksel sinyallerin kimyasal sinyallere çevrilmesinde kritik rol oynar. Kas hücrelerinde Ca^{2+} sarkoplazmik retikulumda depolanır, buradan zar potansiyelindeki değişimlere yanıt olarak riyanodin reseptörlerinin açılması ile dışarı salınır. Depolanmış Ca^{2+} un salınımı sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonunun çok fazla artmasına yol açar, bu



Şekil 13.28 Kalmodulinin görevi
Kalmodulin, dört adet Ca^{2+} bağlama bölgesi olan, davul tokmağı şeklinde bir proteindir. Aktif Ca^{2+}/ kalmodulin kompleksi, Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz gibi çok sayıda hedef proteine bağlanır.

Şekil 13.29 Elektrikle uyarılabilen hücrelerde, hücre içi Ca^{2+} un düzenlenmesi

Zardaki depolarizasyon, voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları açılmasına yol açar, bu da hücre dışı sıvılardan hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. Hücre içi Ca^{2+}'un artması sonucunda, endoplazmik retikulum zarındaki farklı Ca^{2+} kanallarının (riyanodin reseptörleri) açılması yoluyla hücre içi depolardan daha fazla Ca^{2+} salınım sinyalleri iletilir. Kas hücresinde, sarkoplazmik retikulumdaki riyanodin reseptörleri zar depolarizasyonuna yanıt olarak, direkt olarak da açılabilir.



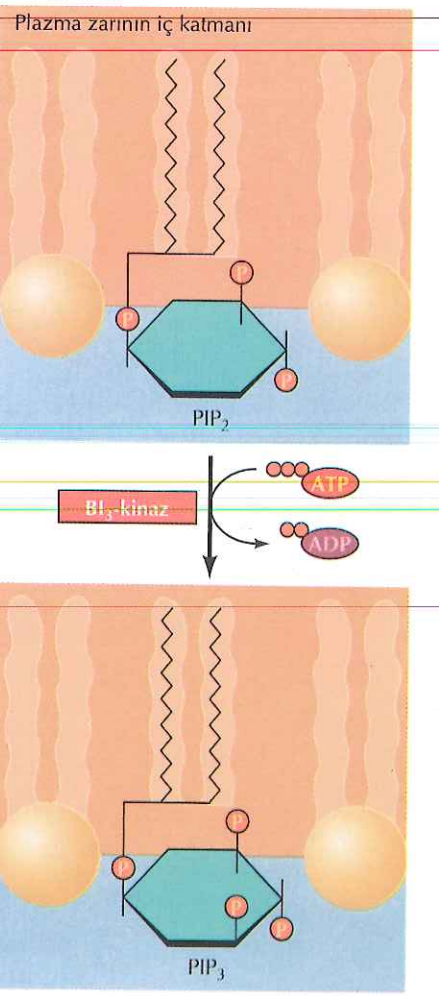
da kas kasılmasını tetikler (bkz. Bölüm 11). Hücreler bu yüzden, hücre içi Ca^{2+} düzeyini düzenlemek için birçok farklı mekanizma kullanır ve düzeyi hızla değişen bir ikinci mesajcı olarak Ca^{2+} çok sayıda hücresel süreci kontrol eder.

PIP_2 yalnızca diaçilgliserol ve IP_3 kaynağı olarak iş görmekle kalmaz, aynı zamanda hücre sağ kalımının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan farklı ikinci mesajcı yolaklarının başlatma noktasında yer alır. Bu yolakta PIP_2, **fosfatidilinositol (PI) 3-kinaz** enzimi tarafından üçüncü pozisyondaki inositolünden fosforillenir (Şekil 13.30). Fosfolipaz C gibi, PI 3-kinazın da bir tipi G proteinleri tarafından aktive edilirken, ikinci tipinin SH2 bölgesi vardır ve reseptör protein-tirozin kinazlar ile bağlanarak aktive olur. PIP_2 fosforilasyonu sonucunda bir diğer ikinci mesajcı olan fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP_3) oluşur. PIP_3 ün ana hedefi hücre sağ kalım sinyalleri için kritik olan ve **Akt** olarak adlandırılan bir protein-serin/treonin kinazdır. PIP_3, Akt'ın plekstrin homoloji bölgesi olarak bilinen bir bölgesine bağlanır (Şekil 13.31). Bu bağlantı Akt'ı fosforile edileceği ve PDK1 olarak adlandırılan bir diğer protein kinaz tarafından aktive edileceği bir yer olan plazma zarının iç yüzüne taşır. Bu nedenle PIP_3 oluşumu, hem Akt'ın hem de PDK1'in plazma zarı ile etkileşimi ile sonuçlanır, bu da Akt fosforilasyonu ve aktivasyonuna yol açar. Akt bir kez aktive olduğu zaman, hücre sağ kalımı düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları da kapsayan, çok sayıda hedef proteini fosforiller.

Ras, Raf ve MAP Kinaz Yolağı

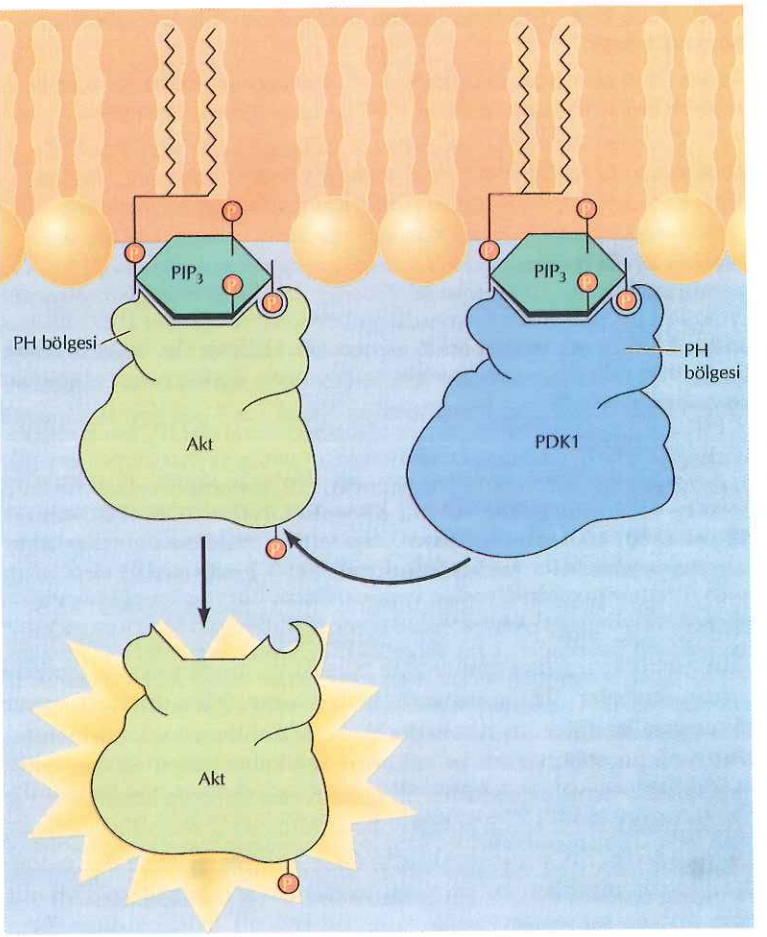
MAP kinaz yolağı denilince, evrimsel olarak korunmuş ve mayadan insana kadar tüm ökaryot hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan, bir dizi protein kinaz anlaşılır. Bu yolağın merkezi elemanları, çok sayıda büyüme faktörü ve diğer sinyal iletimi molekülü uyarımına yanıt olarak aktive olan **MAP kinazlar** (*m*itojen tarafından *a*ktive edilmiş *p*rotein kinaz) denilen bir protein-serin/treonin kinaz ailesidir. Mayalarda, MAP kinaz yolağı eşleşmeyi, hücre şeklini ve sporlanmayı da içeren, çok sayıda hücresel yanıtı kontrol eder. Yüksek ökaryotlarda (*C.elegans*, *Drosophila*, kurbağa ve memeliler) MAP kinazlar aynı anda birçok yerde bulunabilen hücre büyüme ve farklılaşmasının düzenleyicileridir.

MAP kinazlar ilk olarak memeli hücrelerinde ERK (*e*kstraselüler sinyal düzenleyici *k*inaz) ailesi üyesi olarak tanımlanmışlardır. ERK



Şekil 13.30 PI3-kinaz aktivitesi

PI3-kinaz inositolü üçüncü pozisyondan fosforilleyerek, PIP_2 nin PIP_3'e çevrilmesini sağlar.

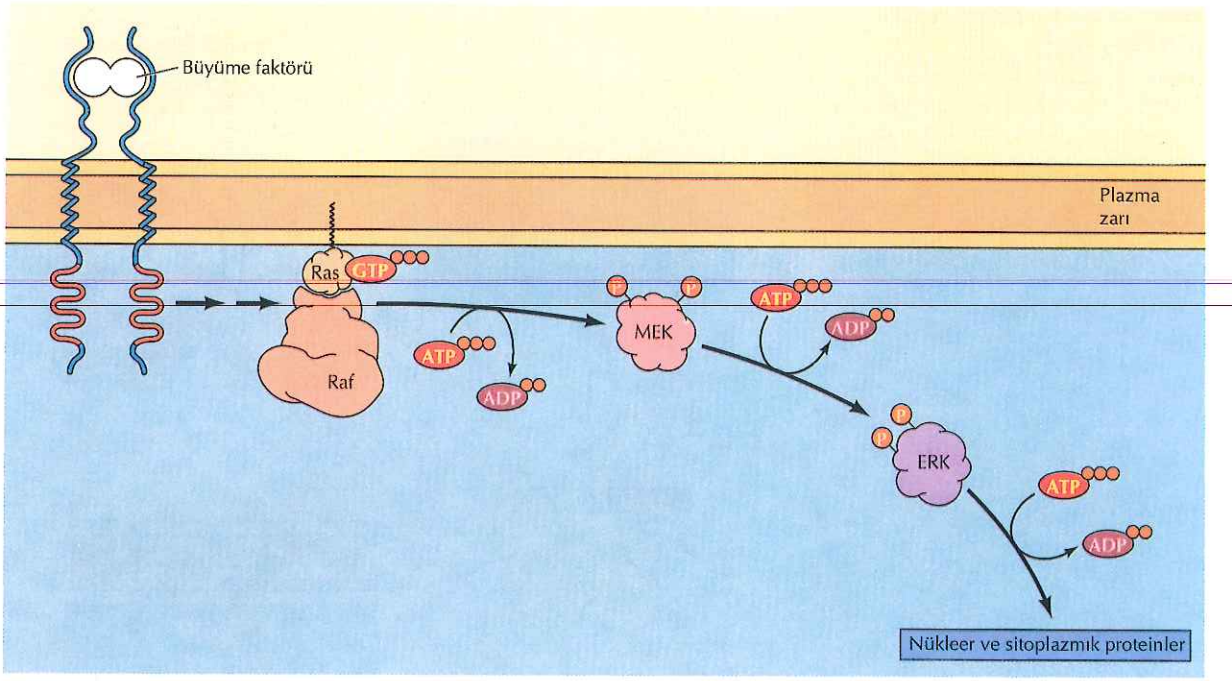


Şekil 13.31 Akt protein kinazın aktivasyonu
Akt, plekstrin homoloji bölgesi (PH) yoluyla PIP_3'e bağlanarak plazma zarına yerleşir. Bu durumda iken PIP_3'e de bağlanan bir diğer protein kinaz ile (PDK1) fosforillenmesi sonucunda aktive olur.

aktivasyonu, ya protein-tirozin kinazlar ya da, G proteinleri-eşlikli reseptörler aracılığı ile uyaran büyüme faktörleri ile uyarılan hücre proliferasyonu sinyal iletiminde merkezi rol oynar. Forbol ester tümör geliştiriciler tarafından uyarılan hücre proliferasyonunun artışına yol açan ERK yolağını da protein kinaz C aktive edebilir. Buna ek olarak, Ca^{2+} ve cAMP yolakları farklı hücre tiplerinde ERK yolağını ya uyararak ya da inhibe ederek ERK sinyalinde kesişirler.

ERK yolağı aktivasyonu, daha yukarıda yer alan ve **Ras** olarak adlandırılan bir GTP -bağlayan protein tarafından büyüme faktörü reseptörleri ile eşleşen iki protein kinaz tarafından düzenlenir (Şekil 13.32). Ras aktivasyonu, **MEK** (MAP kinaz/ ERK kinaz için) denilen ikinci bir protein kinazı fosforilleyecek ve aktive edecek olan bir protein-serin/treonin kinaz olan **Raf** aktivasyonuna yol açar. MEK, ERK ailesi üyelerini bir amino asid farkla, hem treonin hem de tirozin rezidülerinden fosforilleyerek aktive eden, iki yönlü özgüllüğü olan bir protein kinazdır (örn., ERK2 için treonin-183 ve tirozin-185). Bir kez aktive edildiği zaman ERK, diğer protein kinazları ve tanskripsiyon faktörlerini içeren birçok farklı hedefi fosforiller.

ERK yolağının memeli hücrelerinde merkezi rolü, ilk olarak sıçanlarda sarkomalara neden olan tümör viruslarının onkojenik proteinleri olarak tanımlanmış olan Ras proteinleri (bu yüzden Ras adı, *rat sarcoma* virusundan gelir) çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. Ras'a



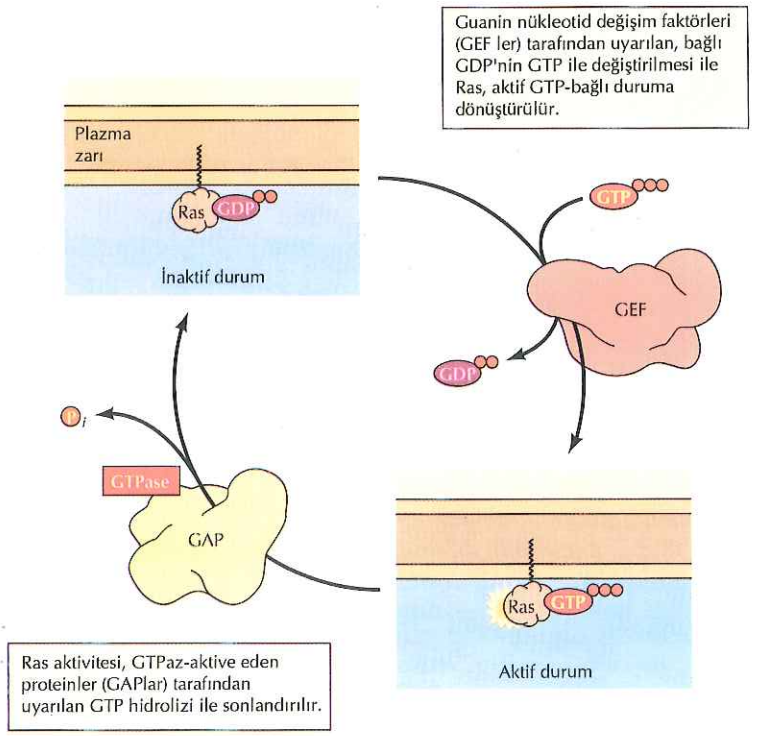
Şekil 13.32 ERK MAP kinazların aktivasyonu
Büyüme faktörü reseptörlerinin uyarılması küçük GTP-bağlayan protein Ras'ın aktivasyonuna neden olur, bu da protein kinaz Raf ile etkileşime girer. Raf çift yönlü spesifitesi olan bir protein kinaz olan MEK'i fosforiller ve aktive eder, o da ERK'i hem treonin hem de tirozin rezidülerinden (Thr-183 ve Tyr-185) fosforiller ve aktive eder. Daha sonra ERK çekirdekte ve sitozoldeki çok çeşitli hedef proteinleri fosforiller.

ilgi 1982'de *ras* genlerindeki mutasyonların, insan kanserlerinin gelişimindeki rolüne ilişkin ilk ipuçlarının elde edildiği zaman, önemli derecede yoğunlaştı (Bölüm 15'de ele alındı). Ras'ın hücre içi sinyal iletimindeki önemi, Ras proteininin mikroenjeksiyonunun normal memeli hücre proliferasyonunu, direkt olarak, uyardığını gösteren deneyler ile doğrulandı. Bunun aksine, ya anti-Ras antikorları ya da dominant negatif Ras mutantı ekspresyonu ile Ras fonksiyonlarının engellenmesi büyüme faktörleri-tarafından uyarılan hücre proliferasyonunu bloklamaktadır. Bu yüzden Ras, yalnızca kanser hücrelerinin anormal çoğalma özelliklerini indüklemekle kalmayıp, normal hücrelerde büyüme faktörü stimülasyonuna yanıt için de gerekli gibi görünmektedir.

Ras proteinleri, G proteinlerinin α alt birimleri ile benzer işlevleri olan, inaktif GDP-bağlı ve aktif-GTP bağlı form arasında değişen, guanin nükletid-bağlayan proteinlerdir (Şekil 13.33). G proteinlerinin α alt birimlerinin aksine, Ras, βγ alt birimleriyle etkileşime girmek yerine monomer olarak fonksiyon gösterir. Ras aktivasyonu bağlı GDP nin salınımını ve GTP ile değişimini uyaran **guanin nükleotid değişim faktörleri** tarafından düzenlenir. Bu durumda Ras-GTP kompleksinin aktivitesi GTP hidrolizi ile sonlandırılır. Bu aktivasyon Ras-GTP ile **GTPaz-aktive eden proteinler**in etkileşimi ile uyarılır. İnsan kanserlerindeki *ras* geni mutasyonlarının Ras proteini tarafından GTP hidrolizini inhibe edici etkisi olması ilgi çekicidir. Bu nedenle mutant Ras proteinleri sürekli aktif GTP-bağlı formda kalırlar ve kanser hücrelerinde büyüme faktörü uyarımı olmaksızın gerçekleşen düzensiz proliferasyona yol açarlar.

Ras proteinleri, yaklaşık 50 proteinden oluşan, Ras ve akrabalarının G proteinlerinin α alt birimlerinin yaklaşık yarısı boyutta olması nedeniyle, sıklıkla **küçük GTP-bağlanan proteinler** olarak adlandırılan büyük bir ailenin prototipidir. Ras proteinleri hücre

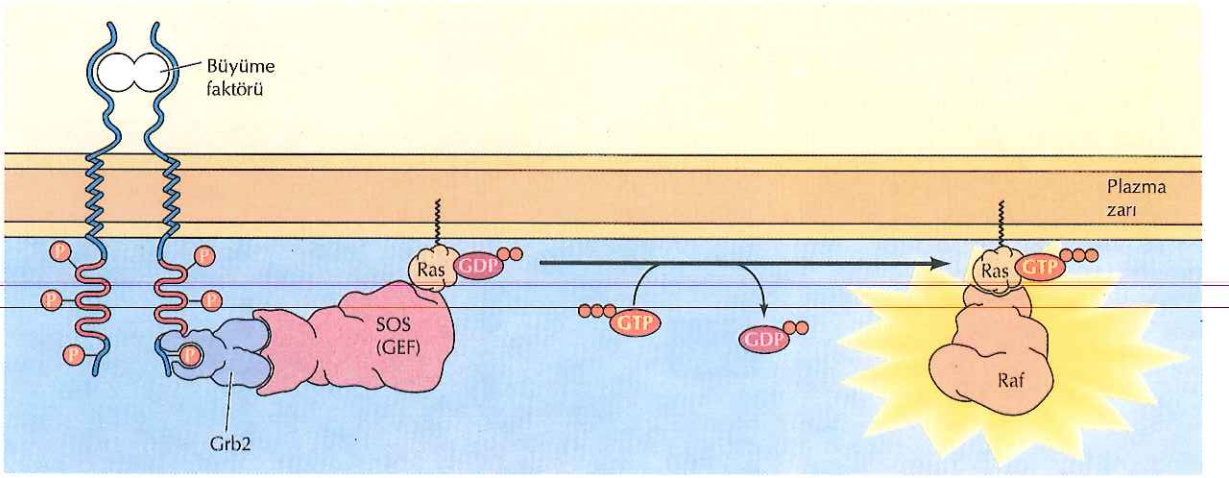
Şekil 13.33 Ras proteinlerinin düzenlenmesi
Ras proteinleri inaktif GDP-bağlı ve aktif GTP bağlı durumlar arasında dönüşürler.



büyüme ve farklılaşmasını düzenlerken, küçük-GTP-bağlayan protein alt aileleri farklı hücresel aktiviteleri kontrol ederler. Örneğin küçük GTP-bağlayan protein ailelerinden en büyüğü olan, Rab proteinlerinin fonksiyonu Bölüm 9'da da açıklandığı gibi, vesikül trafiğini düzenlemektedir. Diğer küçük GTP-bağlayan proteinler (Bölüm 8'de tartışıldığı gibi Ran proteini) proteinlerin çekirdekten içeri ve dışarı taşınması ya da hücre iskeletinin organizasyonuna katılırlar (bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, Rho alt ailesi).

Ras aktivasyonunun en iyi anlaşılan biçimi reseptör protein-tirozin kinazlar tarafından düzenlenir (Şekil 13.34). Bu reseptörlerin otofosforilasyonu, SH2-tarafından düzenlenen protein etkileşimlerinin bir sonucu olarak, Ras guanin nükleotid değiştirme faktörleri ile bağlanması ile sonuçlanır. İyi tanımlanmış örneklerden birisini, uyarı olmadığı zaman, sitozoldeki SH2-içeren bir protein olan Grb2 ye bağlanan bir guanin nükleotid değiştirme faktörü olan Sos oluşturur. Reseptörlerin (veya diğer reseptöre bağlanan proteinlerin), tirozinden fosforilasyonu Grb2SH2 bölgesi için bir bağlanma alanı yaratır. Grb2 nin aktive reseptöre bağlanması Sos'u, C ucundaki lipidler ile plazma zarının iç tabakasına tutunmuş olan Ras proteinleri ile etkileşime girebileceği bir yer olan, plazma zarına taşır (bkz. Şekil 12.9). O zaman Sos'un guanin nükleotid değişimini uyarması, aktif Ras-GTP kompleksinin oluşması ile sonuçlanır. Ras aktif GTP-bağlı formda iken, Raf, protein-serin/treonin kinazları da içeren çok sayıda efektör protein ile etkileşime girer. Ras ile bu etkileşim Raf'ı plazma zarından sitozole taşır, burada hem protein-tirozin hem de protein-serin/treonin kinazlar tarafından fosforilasyonu sonucunda aktive edilir.

Daha önce de belirtildiği gibi, Raf aktivasyonu, ERK aktivasyonuna neden olan bir protein kinaz kaskadının aktivasyonunu başlatır. Bu durumda ERK, protein kinazları da içeren çok sayıda hedef proteini

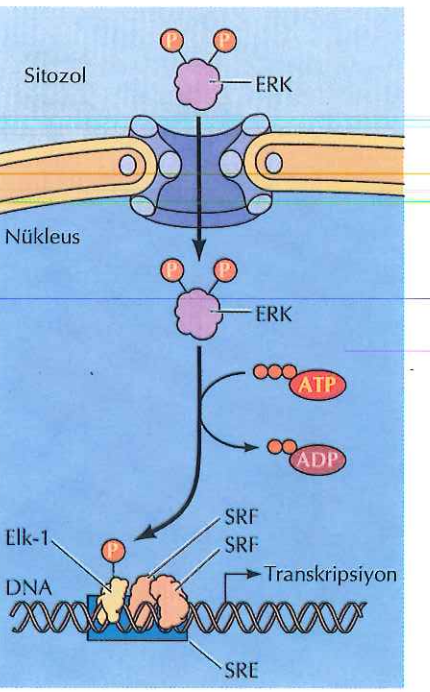


Şekil 13.34 Reseptör protein-tirozin kinazların aşağı yönünde Ras aktivasyonu
Grb2 ve guanin nükleotid değişim faktörü Sos kompleksi, aktif reseptörün fosfotirozin içeren dizisine Grb2 nin SH2 bölgesi aracılığı ile bağlanır. Bu etkileşim Sos un Ras GDP/GTP değişimi uyaracağı yer olan plazma zarına yerleşimini sağlar. Bu durumda aktif Ras-GTP kompleksi bir protein kinaz olan Raf a bağlanır.

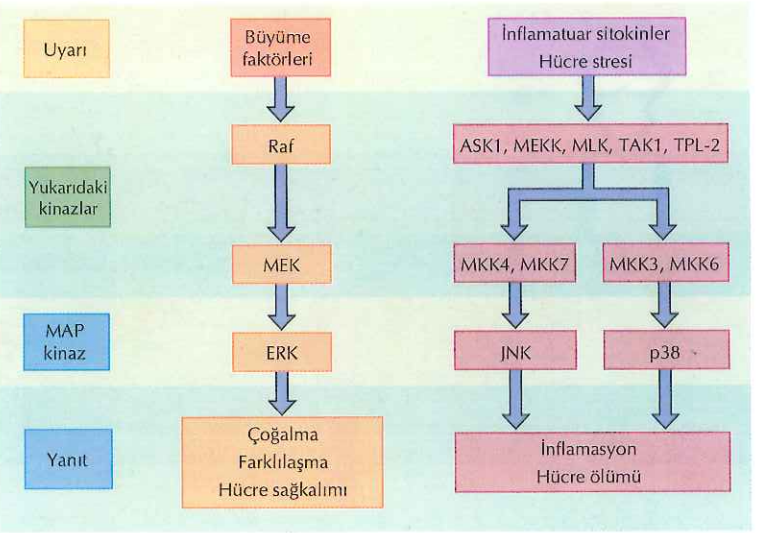
fosforiller. Aktive edilmiş ERK'in bir kısmının, fosforilasyon ile transkripsiyon faktörlerini etkilediği yer olan nükleusa geçmesi çok önemlidir (Şekil 13.35). Bu bağlamda, büyüme faktörü uyarımına primer yanıt olarak, transkripsiyonları hızla uyarılan yaklaşık 100 gen ailesi **acil-erken genler** olarak adlandırılır. Bir grup acil-erken genin uyarımı, **serum yanıt elemanı** (**SRE**) olarak adlandırılan ve **serum yanıt faktörü** (**SRF**) ve **Elk-1**'i de içeren bir transkripsiyon faktörü grubu tarafından tanınan bir düzenleyici dizi aracılığı ile gerçekleşir. Çoğu acil-erken genler, transkripsiyon faktörlerini kodlarlar, böylece bunların büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak indüklenmeleri, aşağı yöndeki diğer bir grup genin ekspresyonunu değiştirir, bu nedenle yeni gen ekspresyonu programları yapılandırılır.

Hem maya, hem de memeli hücrelerinde farklı hücresel yanıtları düzenleyen birçok MAP kinaz yolağı vardır. Her yolak kendi aktivitesini düzenleyen üç protein kinaz içerir: bir terminal MAP kinaz ve iki yukarı yöndeki kinaz (Raf ve MEK analoğu). Bir maya olan *S.cerevisiae*'da, döllenmeyi, sporulasyonu, filamentasyonu, hücre duvarı yeniden düzenlenmelerini ve yüksek ozmolariteye yanıtı düzenleyen beş farklı MAP kinaz yolağı vardır. Memeli hücrelerinde, üç ana grup MAP kinaz tanımlanmıştır. ERK ailesi üyelerine ek olarak, tercihan iflamatuar sitokinlere ve hücresel strese (örn., ultraviole ışınları) yanıt olarak aktive edilen JNK ve p38 MAP kinazları içerir (Şekil 13.36). ERK sinyal iletimi öncelikli olarak hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken, JNK ve p38 MAP kinaz yolakları sıklıkla inflamasyon ve hücre ölümüne neden olur. ERK gibi, JNK ve p38 MAP kinazlar da çekirdeğe geçebilir ve gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini fosforilleyebilir. Bu nedenle her tip ökaryot hücrede farklı çevresel sinyallere karşı hücresel yanıtları kontrol eden, bir çok MAP kinaz yolağı vardır.

MAP kinaz sinyal iletiminin özgüllüğü, en azından kısmen, her MAP kinaz yolağı bileşeninin yapı **iskele** proteinleri ile bağlantılı



Şekil 13.35 ERK tarafından acil-erken genlerin uyarılması
Aktif ERK transkripsiyon faktörü Elk-1'i fosforilleyeceği yer olan çekirdeğe geçer. Elk-1 serum yanıt faktörü (SRF) ile kompleks halinde bulunan serum yanıt elemanı (SRE)'na bağlanır. Fosforilasyon Elk-1'in acil-erken genleri uyaran bir transkripsiyon faktörü olarak aktivite göstermesini sağlar.



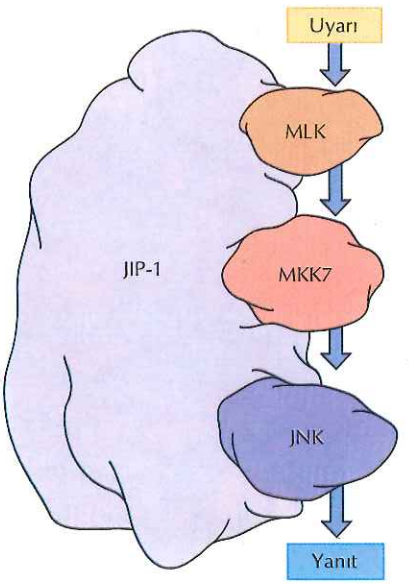
Şekil 13.36 Memeli hücrelerinde MAP kinaz aktivasyon yolakları. Memeli hücrelerinde ERK'e ek olarak, JNK ve p38 MAP kinazlar da vardır. JNK ve MAP kinazların aktivasyonu ERK aktivasyonundan sonumlu protein kinaz yolağı ile paralel olarak düzenlenir. JNK ve p38MAP kinaz aktivasyonuna yol açan protein kinaz yolağı, tercihan inflamatuar sitokinler ile hücresel stres genleri tarafından aktive edilir ve inflamasyon ve hücre ölümü ile sonuçlanır.

kompleksler halinde düzenlenmesi ile sağlanır. Örneğin JIP-1 yapı iskelesi proteini bir sinyal kaseti oluşturarak, JNK MAP kinazı düzenler ve bunun yukarı yöndeki aktivatörleri MLK ve MKK7 dir (Şekil 13.37). JIP-1 iskelesi üzerindeki bu protein kinazların spesifik etkileşimleri sonucunda, MLK'nın yukarı yöndeki uyaranlar ile aktivasyonu, MKK7'nin spesifik ve etkin bir şekilde aktivasyonuna yol açar, bu da, sonuçta JNK'i aktive eder. Farklı iskele proteinleri yalnızca MAP kinaz sinyal taşıyıcılarının düzenlenmesi ile ilgili olmayıp, aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri ile reseptörlerine de bağlanabilirler. Sinyal iletimi yolaklarındaki bileşenlerin iskele proteinleri aracılığı ile fiziksel olarak bağlanmalarının, hücre içindeki sinyal ileti yolaklarının spesifitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

JAK/STAT Yolağı

MAP kinaz yolağı, sonuçta transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna yol açan bir protein kinaz yolağı olarak, hücre yüzeyi ile çekirdeği arasında indirekt bir bağlantı sağlar. **JAK/STAT yolağı** olarak bilinen alternatif bir yolak olarak, protein-tirozin kinazlar ve transkripsiyon faktörleri arasında çok daha hızlı bir bağlantı sağlar. Bu yolakta, protein-tirozin fosforilasyonu transkripsiyon faktörlerinin yerleşimini ve fonksiyonlarını direkt olarak etkiler (Şekil 13.38).

Bu yolaktaki anahtar elemanlar, ilk olarak sitokin reseptör sinyal iletimi çalışmaları ile tanımlanmış olan **STAT proteinleridir** (sinyal çevirimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri). STAT proteinleri, SH2 bölgeleri olan bir transkripsiyon faktörü ailesidir. Uyarılmamış hücrelerde inaktifdirler ve sitoplazmada yerleşmişlerdir. Sitokin reseptörlerinin uyarılması, SH2 bölgeleri aracılığı ile polipeptid reseptörlerin sitoplazmik bölümlerindeki fosfotirozin içeren dizilere bağlanmaları, STAT proteinlerinin yer değişimine neden olur. STAT proteinleri, aktif reseptörlere bağlanmalarını takiben, sitokin reseptörleri ile bağlanmış olan, reseptör olmayan protein-tirozin



Şekil 13.37 JNK MAP kinaz yolağındaki bir iskele proteini JIP-1 iskele proteini MLK, MKK7 ve JNK'e bağlanır, JNK yolağının bu elemanlarını bir sinyal taşıyıcısı içinde düzenli olarak tutar.

kinazların JAK ailesi üyeleri tarafından fosforillenir. Tirozin fosforilasyonu STAT proteinlerinin dimerizasyonunu uyarır, böylece hedef genlerinin transkripsiyonunu uyaracakları yer olan nukleusa geçerler.

Daha sonraki çalışmalar STAT proteinlerinin reseptör protein-tirozin kinazların aşağı yönünde de aktif olduklarını gösterdi. Burada STAT'ların fosforilasyonu, hem reseptörlerin kendileri, hem de bağlı oldukları reseptör kinazlar tarafından katalizlenebilir. STAT transkripsiyon faktörleri böylece hücre yüzeyindeki sitokin ve büyüme faktörleri ile çekirdekteki gen ekspresyonunun düzenlenmesi arasındaki direkt bağlantıyı sağlarlar.

Sinyal İletimi ve Hücre İskeleti

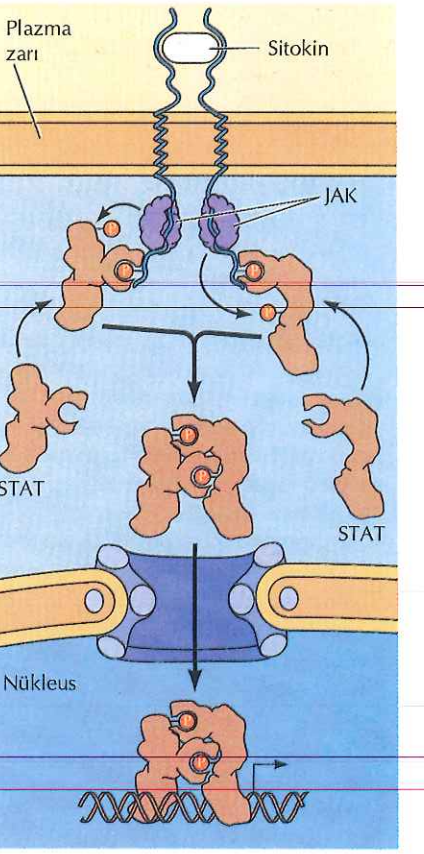
Önceki kısımlarda hormonlar ya da büyüme faktörlerine yanıt olarak gerçekleşen metabolizma veya gen ekspresyonu değişikliklerini düzenleyen sinyal ileti yolakları üzerine odaklandık. Ancak, çoğu hücrenin fonksiyonları hücre adezyonu ve hücre iskeleti organizasyonu tarafından da direkt olarak etkilenir. Bu yüzden, hücre adezyonunundan sorumlu reseptörler, gen ekspresyonunu da içeren diğer bazı hücre davranışlarını düzenleyen, hücre içi sinyal ileti yolaklarını başlatıcı rol oynayabilir. Bunun tam tersine, büyüme faktörleri sıklıkla hücre göçü veya hücre şekil değişiklikleri ile sonuçlanan hücre iskeleti değişikliklerini uyarıcı etki gösterebilir. Böylece sinyal ileti yolaklarında, hücre iskeleti bileşenleri diğer hücresel yanıtlar ile hücre şeklini ve göçünü entegre ederek, hem reseptör hem de hedef olarak etkili olabilirler.

İntegrinler ve Sinyal İletimi

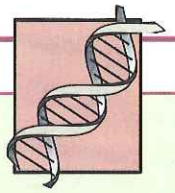
İntegrinler, Bölüm 11 ve 12'de de tartışıldığı gibi, hücrelerin hücre dışı matrise tutunmasından sorumlu önemli reseptörlerdir. İki tip hücre-matris bağlantısında (fokal adezyonlar ve hemidesmozomlar), integrinler hücre iskeleti bileşenleri ile etkileşime girerek, hücre dışı matris ile tutunan hücre arasındaki sabit bağlantıyı da sağlarlar (bkz. Şekil 12.62). Bu yapısal role ek olarak, integrinler adezif etkileşimlere yanıt olarak hücre içi sinyal ileti yolaklarını aktive eden, böylece gen ekspresyonunu ve hücre proliferasyonu ile sağ kalımını da içeren, diğer hücre davranışları kontrol eden reseptörler olarak da görev alırlar.

Sitokin reseptör süper ailesi üyeleri gibi, integrinlerin de, içsel enzimatik aktivitesi olmayan kısa sitoplazmik kuyrukları vardır. Ancak, integrinlerin hücre dışı matris bileşenleri ile etkileşimlerine erken yanıtının protein-tirozin fosforilasyonu olması, integrinlerin reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. İntegrinlerin aşağı yöndeki sinyal iletiminin bir tipi FAK (*f*okal *a*dezyon *k*inaz) olarak adlandırılan bir reseptör olmayan protein-tirozin kinazın aktivasyonu ile gerçekleşir (Şekil 13.39). Adından da anlaşılabileceği gibi, FAK, fokal adezyonlarda yerleşir ve integrinlerin fibronektin gibi hücre dışı matris bileşenlerine bağlanmasını takiben, tirozinden hızla fosforillenir. Diğer protein kinazlar gibi, FAK aktivasyonu hücre dışı matrise bağlanan integrinlerin gruplaşması sonucunda otofosforilasyonun uyarılması ile ilişkilidir.

FAK otofosforilasyonu, FAK üzerindeki diğer bölgeleri de fosforilleyen, Src ailesi reseptör olmayan protein-tirozin kinazların üyelerini de içeren, SH2 bölgeleri bulunan sinyal iletimi molekülleri



Şekil 13.38 JAK/STAT yolağı
STAT proteinleri SH2 bölgesi olan transkripsiyon faktörleridir, bu bölgeler onların fosfotirozin içeren dizilere bağlanmasını sağlar. Uyarılmamış hücrelerde, STAT proteinleri sitozolde inaktif durumdadır. Sitokin reseptörlerinin uyarımı, STAT proteinlerinin reseptöre bağlanmalarına yol açar, burada reseptör ile bağlantılı JAK protein-tirozin kinaz tarafından fosforillenirler. Daha sonra fosforile STAT proteinleri dimerize olurlar ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edecekleri yer olan nükleusa geçerler.



MOLEKÜLER TIP

Kanser: Sinyal İletimi ve ras Onkogenleri

Hastalık

Kanser, her dört Amerikan vatandaşından bir tanesinin yaşamını tehdit etmekte ve Amerika Birleşik Devletler'inde her yıl 500,000'den fazla ölüme yol açmaktadır. Bilinen 100 den fazla kanser çeşidi vardır, ancak bazı kanserler diğerlerine göre daha sık gözlenir. ABD'de en yaygın olan ölümcül kanser çeşitleri arasında akciğer ve kolon gelmektedir ki, bu iki kanser çeşidi kanser kökenli ölümlerin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Kanser kökenli mortaliteye etki eden diğer temel kanser çeşitleri meme, prostat ve pankreastır ve bunlar, sırasıyla, ölümlerin %7.2, %5.2 ve %5.4'ünden sorumludur.

Bütün kanserlerin ortak özelliği, vücut geneline yayılan, normal doku ve organları sararak hastanın ölümüne neden olan kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonudur. Bölgesel kanserlerin tedavisinde cerrahi müdahale ve radyoterapi etkili olmakla birlikte, bu tedaviler vücutta uzak bölgelere yayılmış olan kanser hücrelerine ulaşmada etkin olamamaktadırlar. Bu nedenle bu kanserlerin tedavisinde kemoterapötik ilaçların kullanılması gerekmektedir. Günümüzde kullanılmakta olan kematerapötik ilaçlar maalesef kanser hücrelerine özgül değildir. Çoğu DNA'da hasar oluşturarak ya da DNA sentezini engelleyerek etki göstermektedir. Bu yüzden sindirim sistemini kaplayan epitel hücreleri ve kemik iliğindeki kan yapan hücreler gibi, hızla bölünmekte olan normal hücreleri de öldürmektedirler. Bu ilaçların toksisiteleri etkinliklerini kısıtlamakta ve hasta tarafından tolere edilebilen dozları, birçok kanserin elimine edilmesinde yeterli olamamaktadır. Sonuç olarak, kanser tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen kanser tanısı konmuş olan hastaların yaklaşık yarısı hastalık nedeniyle ölmektedir.

Moleküler ve Hücresel Temel

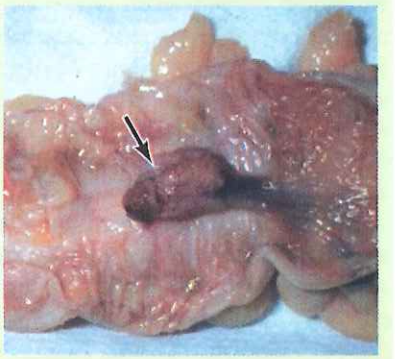
RSV'un *src* geni gibi normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürebilen viral genlerin tanımlanması, ilk kez kanserin spesifik genlerin (onkogenlerin) etkileri sonucunda oluşabileceğini göstermiştir. Bunun devamında, viral onkogenlerin normal hücrelerin genleri ile benzer olduğunun anlaşılması, virus tarafından uyarılmamış kanserlerin (ki bu grup birçok insan kanserini kapsamaktadır) normal hücresel genlerdeki mutasyonlar sonucunda oluşabildiğini göstermiştir. Bir başka deyişle, bu tip kanserlerde viral köken yerine hücresel kökenli onkogenler önemli olmaktadır. Bu gibi hücresel onkogenler insan kanserlerinde ilk olarak 1981 yılında tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra, mesane, akciğer ve kolon kanserlerindeki insan onkogeninin, daha önce sıçan sarkom viruslarında tanımlanmış olan, *ras* genlerine benzer oldukları bulunmuştur.

Günümüzde birçok farklı genin kanser gelişiminde kritik rol oynadığının bilinmesine rağmen, *ras* genindeki mutasyonlar insan tümörlerinde en yaygın görülen genetik bozukluktur. Mutant *ras* onkogenleri, akciğer kanserlerinin %25'inde, kolon kanserlerinin %50'sinde ve pankreatik kanserlerin %90'dan fazlasında ve bütün insan kanserlerinin yaklaşık %20'sinde gözlenmektedir. Üstelik, *ras* onkogenlerinin etkileri, hücre proliferasyonunu düzenleyen sinyal ileti yollarındaki bozukluklar ile insan kanser gelişimi arasında bir ilişkili olduğunu açıklığa kavuşturmuştur.

Normal *ras* genini onkogene dönüştüren mutasyonlar Ras proteinleri tarafından gerçekleştirilen GTP hidrolizini azaltmaktadır. Bunun sonucunda mutant onkojenik Ras proteinleri, hücre dışı sinyallere yanıt olarak inaktif ve aktif formlar arasında geçiş göstermek yerine, aktif GTP-bağlı formda kalmaktadır. Bu nedenle Ras'ı aktive etmek ve normal hücrelerin proliferasyonu ile ilgili sinyalleri iletmek için gerekli olan büyüme faktörlerinin yokluğunda bile onkojenik Ras proteinleri ERK sinyal yolunu sürekli olarak uyararak hücre proliferasyonunu tetikleyebilmektedir.

Önlem ve Tedavi

İnsan kanserlerinde mutasyona uğramış onkogenlerin varlığının gösterilmesi ile onkogen proteinlerini hedefleyen spesifik ilaçların geliştirilmesi olasılığı ortaya çıkmıştır. Kural olarak, bu gibi ilaçlar, geleneksel kemoterapötik ilaçların aksine kanser hücreleri üzerinde selektif etki gösterebilirler. İnsan kanserlerinde *ras* geni sıklıkla mutant



İnsan kolon polip örneği (kolon kanserinde erken evre). *ras* onkogenleri bütün kolon kanserlerinin, yaklaşık yarısının gelişimine etki etmektedir (E.P. Ewing, Jr., Centers for Disease Control).

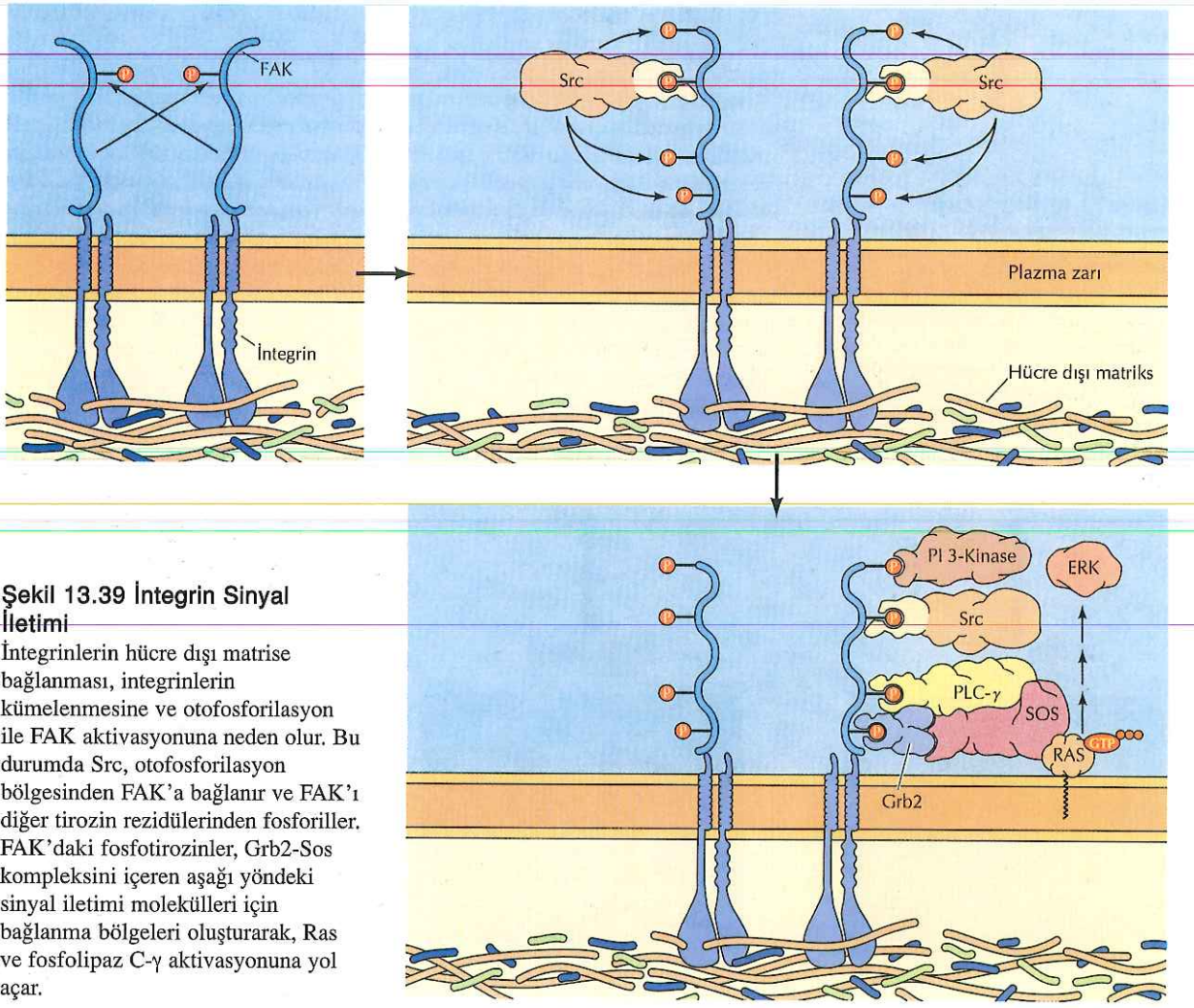
için tutunma bölgeleri yaratır. Büyüme faktörü reseptörleri için de tartışıldığı gibi, FAK'ın tirozin fosforilasyonu, fosfolipaz C-γ, PI3-kinaz ve Grb2-Sos kompleksini de içeren, SH2 bölümleri için bağlanma bölgeleri yaratır. Sos'un Guanin nükleotid değişim faktörü

formda bulunduğundan, bu gen ürünü olan proteinler potensiyal ilaç hedefi olarak dikkat çekmektedir.

Ras fonksiyonunun önemli yönlerinden birisi, Ras proteinlerinin plazma zarına yönlenmesi aşamasında proteinin karboksi terminaline, post translasyonel olarak, lipid (farnezil izoprenoid) eklenmesidir (bkz. Şekil 7.32). Her ne kadar, farnezilasyon Ras'a özgü olmasa da, hücresel proteinler için nispeten çok yaygın bir modifikasyon değildir. Bu nedenle bazı araştırma grupları Ras'ı hedefleyen potensiyel ilaçlar olarak farnezil transferaz enzim inhibitörlerini geliştirmektedirler. Bu gibi ilaçların sadece Ras'ın hücre zarındaki yerleşimini ve fonksiyonunu inhibe etmekle kalmadığı, aynı zamanda insan tümör hücrelerine karşı aktivite gösterdiği saptanmıştır. Her ne kadar, bu bileşiklerin aktivitelerinin bazıları Ras'ın dışında diğer hedeflere yönelik olabilmekle beraber, birkaç farnezil transferaz inhibitörü klinik olarak denenmektedir. İnsan kanserlerinin tedavisinde bu ilaçların potansiyeli hakkında verilerin, yakın gelecekte elde edilmesi öngörülmektedir.

Referans

Prendergast, G.C. and Oliff A. 2000. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic properties, mechanisms of action, and clinical prospects. *Semin.Cancer Biol.*10:443-452



Şekil 13.39 İntegrin Sinyal İletimi

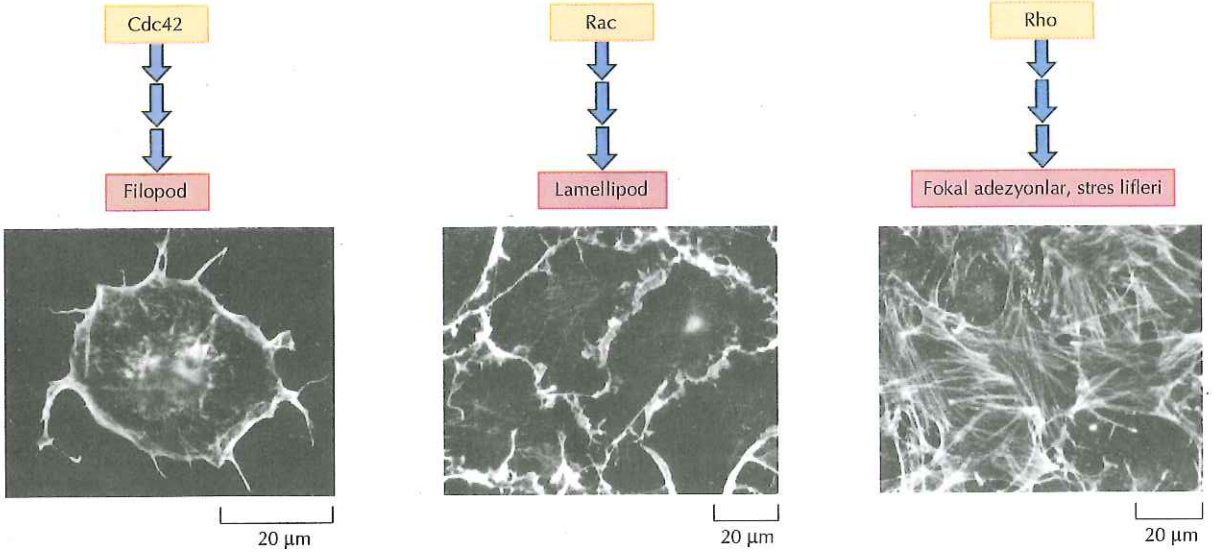
İntegrinlerin hücre dışı matrise bağlanması, integrinlerin kümelenmesine ve otofosforilasyon ile FAK aktivasyonuna neden olur. Bu durumda Src, otofosforilasyon bölgesinden FAK'a bağlanır ve FAK'ı diğer tirozin rezidülerinden fosforiller. FAK'daki fosfotirozinler, Grb2-Sos kompleksini içeren aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri için bağlanma bölgeleri oluşturarak, Ras ve fosfolipaz C-γ aktivasyonuna yol açar.

Sos'un olaya karışması Ras'ın aktivasyonuna yol açar, böylece integrinler aracılığı ile ERK yolaklarının aktivasyonu gerçekleşir. Bu nedenle FAK'ın ve Src reseptör olmayan protein-tirozin kinazların integrin aktivasyonu, hücre adezyonu ile ilişkili aşağı yöndeki bazı sinyal ileti yolakları ile bağlantılıdır. Gen ekspresyonunu, hücre proliferasyonunu ve sağ kalımını düzenleyen bu yolaklar büyüme faktörleri reseptörlerinin aşağı yönündedir. Ek olarak, integrinler EGF reseptörü gibi, reseptör protein-tirozin kinazlar ile etkileşime girebilir ve aktivitelerini uyarabilir, böylece büyüme faktörleri ve hücre adezyonu tarafından uyarılan sinyal ileti yolaklarının paralel aktivasyonunu sağlarlar.

Aktin Hücre İskeletinin Düzenlenmesi

Büyüme faktörlerini de kapsayan hücre dışı uyarılara hücresel yanıtlar, genellikle hücre hareketi ve hücre şeklindeki değişiklikleri içerir. Örneğin hücre hareketindeki (hücre proliferasyonundaki gibi) büyüme faktörleri tarafından uyarılan değişiklikler, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişim gibi süreçlerde kritik roller oynarlar. Bölüm 11'de de tartışıldığı gibi, hücre davranışının bu yönleri öncelikle aktin hücre iskeleti tarafından belirlenir. Özellikle, birçok hücre hareket biçimi, plazma zarının altında yer alan aktin filamanlarının dinamik yapılanması ve yıkılması esasına dayanmaktadır. Aktin hücre iskeletinin yeniden yapılanması, bu yüzden çoğu büyüme faktörü ve diğer hücre dışı uyaranlara yanıtta anahtar elemanlardır.

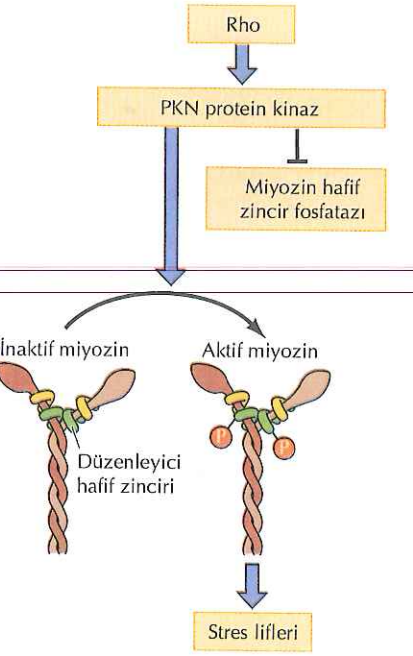
Küçük GTP-bağlayan proteinlerin Rho alt ailesi üyeleri (**Rho, Rac** ve **Cdc42** yi içeren), aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde ve böylece hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinez gibi çok çeşitli hücresel olayın kontrolünde merkezi rol oynarlar. Rho ailesi üyelerinin, aktin yeniden şekillenmesinin: farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (Şekil 13.40). Büyüme faktörleri uyarımı sonucunda oluşan hücre iskeleti değişiklikleri arasında hücre yüzey uzantılarının: (filopodlar, lamellipodlar ve zar kıvrımları), fokal adezyonların ve stres liflerinin oluşumu yer alır. Hücrelere farklı Rho ailesi üyelerininin spesifik



Şekil 13.40. Rho ailesi proteinler ile aktin yeniden düzenlenmesi
Rho ailesinin farklı üyeleri, aktin polimerizasyonunu filapod (Cdc42), lamellipod (Rac) ve stress fiberleri (Rho) oluşumunu sağlayacak şekilde düzenler. Floresan mikrograflar fibroblastların Cdc42, Rac ve Rho ile mikroenjeksiyonunu takiben aktin dağılımını göstermektedir (C.D. Nobes ve A. Hall, 1995. *Cell* 81:53).

mutantlarının mikroenjeksiyonu, Cdc42'nin filopod oluşumunu uyardığını, Rac'ın lamellipod oluşumunu düzenlediğini, ve Rho'nun stres liflerinin oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar, Rho ailesi üyelerinin aktivitesinin fibroblastlarla sınırlı kalmadığını: bütün ökaryot hücre tiplerinde aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde benzer rol oynadıklarını göstermiştir. Örneğin, Rho, aktin-miyozin daralan halkası aracılığıyla sitokinez (mitozu izleyen hücre bölünmesi) için gereklidir (Şekil 11.28). Sinir hücrelerinde, Rac, Cdc42 ve Rho sinir sistemi gelişimi sırasındaki akson uzama ve kısalmalarını düzenler. Düz kas hücrelerinde, Rho kas kasılmasının düzenlenmesine katılır. Epitel hücrelerinde, Rho ailesi üyeleri, kaderinler ile aktin hücre iskeleti bağlantısını içeren aterens bağlantıların oluşumunu düzenler (bkz. Şekil 12.64). Bu yüzden Rho ailesi üyeleri, hücre dışı sinyaller ile hücre şekli ve hareketi değişikliklerini bağlayarak, aktin hücre iskeletinin genel düzenleyicileri olarak görev yaparlar. Ek olarak, Rho ailesi üyeleri gen ekspresyonu değişikliklerine yol açmaktan, vesikül taşınması ve hücre polaritesine kadar diğer hücresel aktiviteleri etkileyen MAP kinaz sinyal ileti yolağını aktive edebilirler.

Rho, Rac ve Cdc42 nin potansiyel hedefi olarak çok sayıda protein tanımlanmıştır, ancak bu aday proteinlerden çoğunun hücresel rolleri açıklanmayı beklemektedir. Rho'nun hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerinden birisi, PKN olarak adlandırılan bir protein serin/treonin kinazdır (Şekil 13.41). PKN aktivasyonu, miyozin II hafif zincirinin aktivasyonunu iki mekanizma ile artırır: PKN miyozin hafif zincirini direkt olarak fosforillemekle kalmaz, aynı zamanda miyozin hafif zincir fosfatazlarını da, fosforilleyerek inhibe eder. Sonuçta miyozin hafif zincir fosforilasyonundaki artış, miyozini aktive eder ve aktin-miyozin filamanlarının yapılanmasına yol açar. Bu da stres liflerinin, fokal adezyonların, aterens bağlantıların ve sitokinezin oluşumu gibi, hücre iskeleti değişiklikleri ile sonuçlanır. Rac ve Cdc42, ikisi de aktin polimerizasyonun uyarımı ile hücre yüzey uzantılarının (filopod ve lamellipod) oluşumu sağlar. Bu olayın Rac ve Cdc42'nin aktin flamanlarının oluşumunu uyarmak için Arp 2/3 kompleksi (bkz. Şekil 11.5) ile etkileşime girebilen birçok hedefi tarafından düzenleniyor gibi görülmektedir, ancak bu etkileşimlerin ayrıntıları henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

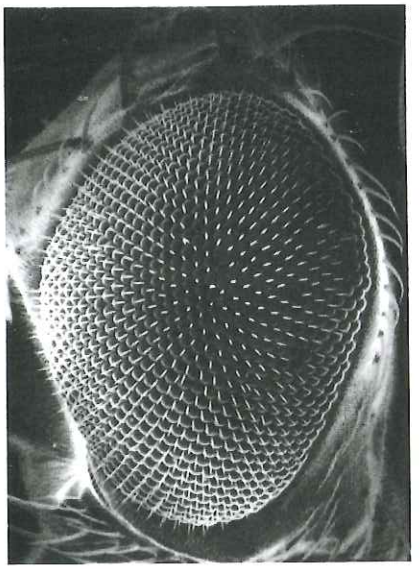


Şekil 13.41 Miyozin hafif zincir fosforilasyonunun Rho tarafından düzenlenmesi
Rho, bir protein kinaz olan PKN'i aktive eder, bu da miyozin II'nin düzenleyici hafif zincirini fosforiller ve miyozin hafif zincir fosfatazı inhibe eder. Hafif zincirin fosforilasyonunun artması sonucunda miyozin II aktive olur, bu da aktin-miyozin yapılanmasına ve stres liflerinin oluşumuna neden olur.

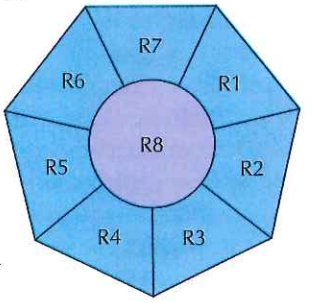
Gelişim ve Farklılaşmada Sinyal İletimi

Hayvan gelişimini yönlendiren moleküler mekanizmaların anlaşılması, çağdaş hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin en zorlayıcı konularından birisidir. Yalnızca tek bir hücreden, döllenmiş yumurtadan, başlayarak vücuttaki farklı hücre tiplerinin tamamı doku ve organlar oluşturacak şekilde üretilir ve düzenlenir. Hem hücre faklılaşması hem de vücut yapısının gelişimi, her bir hücrenin aktivitesini ve sonuçta insan kadar karmaşık organizmaların oluşumunu düzenleyen, son derecede sıkı kontrol edilen hücre-hücre sinyal iletim yolakları tarafından düzenleniyor olmalıdır. Her ne kadar gelişim biyolojisinin ayrıntılı olarak tartışılması bu kitabın konusu olmasa da, gelişim ve farklılaşmanın birçok yönünden sorumlu sinyal ileti yolaklarının tanımlanmasındaki büyük ilerlemeler dikkate değerdir. Burada, bu gibi sinyal ileti yolaklarından üç örnek incelenecektir.

(A)



(B)



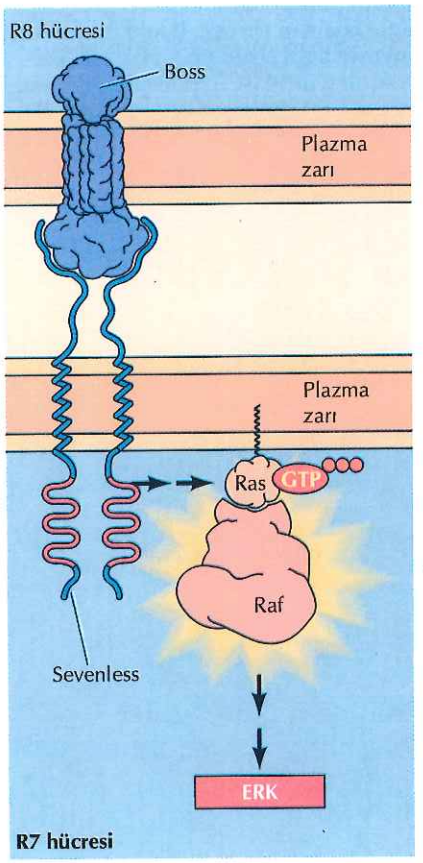
Şekil 13.42 *Drosophila*'nın bileşik gözü
(A) Bileşik gözün tarama elektron mikroskop mikrografları yaklaşık 800 tek, tek üniteden yapıldığını göstermiştir. (B) Her ünite belirli bir sıra ve kalıba uygun olarak gelişen sekiz fotoreseptör nöronu (R1 den R8 e kadar numaralandırılan) içerir (A, T.Venkatesh'ın nazik katkılarıyla, Şehir Kolleji, New York).

Drosophila ve C.elegans'daki Reseptör Tirozin Kinaz/Ras/Raf/ERK Yolağı

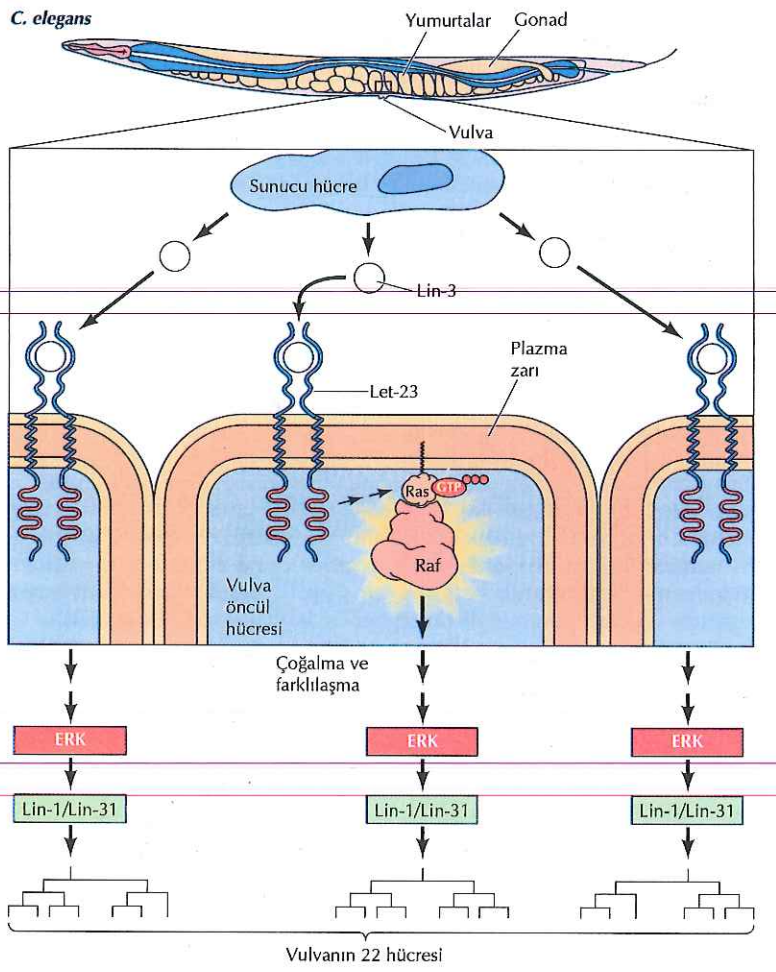
Ras/ Raf/ ERK yolaklarını aktive eden reseptör tirozin kinazlar ile sinyal iletimi, pek çok hücre tipinde gelişim ve farklılaşmayı düzenler. Omurgalılarda çok iyi çalışılmış bir örnek olarak, sinir büyüme faktörü reseptörünün (bir reseptör tirozin kinaz) aktivasyonu ve Ras/Raf/ ERK'in sonraki uyarıları tarafından düzenlenen, sinir hücrelerinin farklılaşması verilebilir. Ancak bu yolağın gelişimdeki anahtar rolü, daha net olarak, model organizmalar olan *Drosophila* ve *C.elegans*'da gerçekleştirilen genetik analizler ile gösterilmiştir.

Farklılaşmada direkt hücre-hücre sinyal iletiminin rolünü de örnekleyen Ras/ Raf/ ERK yolağı ile sinyal iletimi, *Drosophila*'nın bileşik göz gelişiminde anahtar bir rol oynar. *Drosophila*'nın bileşik gözü 800 kadar tekli üniteden oluşmuştur ve bu ünitelerden her biri, sekiz fotoreseptör sinir hücresi (R1 den R8'e kadar) ve 12 lens hücresi içerir (Şekil 13.42). Fotoreseptör nöronları R8'in farklılaşması ile başlayan belirli bir sıra ile gelişir. R8 sonradan R2 ve R5 fotoreseptörleri olacak olan iki komşu hücreyi uyarır. Daha sonra R2, R1 ve R3'e dönüşecek olan komşu hücreleri uyarır, R5 ise R4 ve R6 olacak komşu hücreleri uyarır. Farklılaşmadaki son basamak, R8 ile etkileşim ile uyarılan R7 dir. Böylece bu hücrelerden fotoreseptörlere farklılaşmayacak olan lens hücreleri gelişir.

R7 hücrelerinin gelişimini sağlayan sinyal ileti yolağı, R7 gelişimi olmayan mutant sineklerin elde edilmesi ile ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (Şekil 13.43). Bu mutantlardan birisi (*sevenless*), R7 hücresi öncülleri tarafından eksprese edilen bir reseptör protein-tirozin kinazı kodlayan bir genin çıkarılması sonucunda elde edilmiştir. Bir diğer mutant (*bride-of-sevenless* in kısaltması olarak *boss* denilen) R8 hücreleri tarafından eksprese edilen bir geni kodlayan genin defekti ile oluşturulmuştur. *Boss, Sevenless*'in ligandıdır, bu yüzden, R8 ile bir öncül hücre arasındaki direkt hücre-hücre etkileşimi Sevenless protein-tirozin kinazı aktive eder. Daha ileri çalışmalar Sevenless sinyal iletimi tarafından uyarılan hücre farklılaşmasının Ras ve Raf'a da gerek duyduğunu göstermiştir. Bu ERK MAP kinaz aktivasyonuna yol açar ve R7 farklılaşmasını sağlayacak transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ile sonuçlanır.



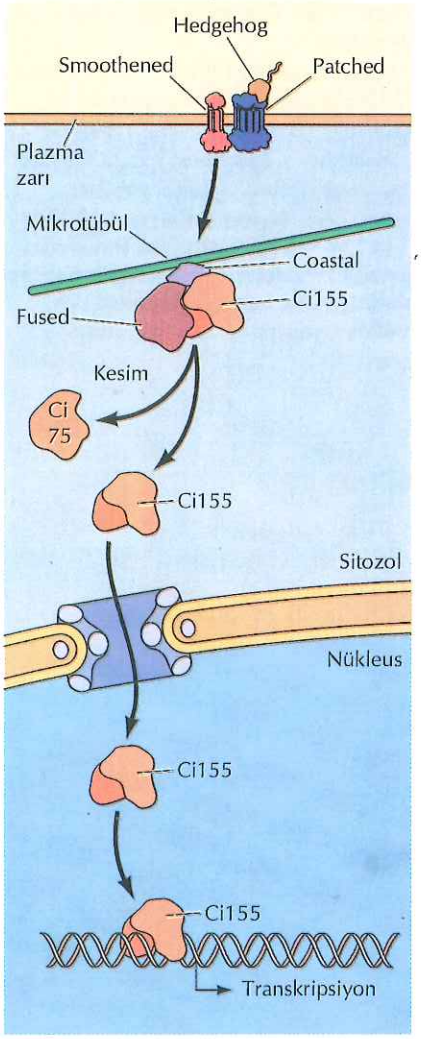
Şekil 13.43 R7 farklılaşmasının uyarımı
R7 fotoreseptör sinir hücrelerinin farklılaşması, öncül hücrelerin R8 ile teması ile uyarılır. R8 hücrelerinin yüzeyindeki Boss proteini, R7 öncül hücresinde eksprese edilen bir protein-tirozin kinaz olan Sevenless'in ligandıdır. Sevenless'in uyarımı Ras/ Raf/ ERK yolağının aktivasyonunu uyarır.



Şekil 13.44 *C.elegans*'da vulva uyarımı
Gonadal sunucu hücreleri EGF ile akraba Lin-3'ü salgılar. Lin-3 vulva öncül hücrelerde eksprese edilen bir reseptör protein-tirozin kinaz olan Let-23'ü uyarır. Aktif Let-23 Raf/Ras/ERK yolağını uyarır. ERK iki transkripsiyon faktörünü (Lin-1 ve Lin-31) fosforiller, bunlar da sonuçta vulvanın 22 hücresini oluşturacak olan, üç vulva öncül hücresinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır.

Bir nematod olan *C.elegans*'ın vulva gelişimi, genetik analizler ile ortaya çıkarılan ve Ras/ Raf/ ERK yolağının rolünü gösteren bir diğer örnektir. Bu sistemde, ilk olarak gonadal sunucu hücreye dönüşecek olan bir tek hücre farklılaşır ve uterusda vulvaya bağlanır. Sunucu hücre daha sonra vulvadaki 22 hücreyi oluşturacak olan üç öncülün farklılaşmasını uyarır.

Vulva gelişiminin olmadığı mutantların izolasyonu, vulva uyarımı için gerekli bir kaç genin tanımlanmasını sağladı ve böylece, sunucu hücrenin, vulva öncül hücrelerinin farklılaşmasını uyardığı yolak çözümlenmiş oldu (Şekil 13.44). Bu genlerden birisi, *lin-3* memeli büyüme faktörü EGF ile ilişkili bir protein kodlar. Lin-3 proteini sunucu hücrelerinden salgılanır ve vulval öncül hücreler üzerinde eksprese olan bir reseptöre bağlanır (Let-23). Let-23 memeli EGF reseptörü ile ilişkili bir reseptör protein-tirozin kinazdır. Vulva uyarımı için gerekli diğer genler *let-60* ve *lin-45*'i içerir ve sırasıyla *C.elegans* Ras ve Raf proteinlerini kodlar. Bu yüzden, *C.elegans* vulva gelişimi, bir reseptör protein-tirozin kinazın büyüme faktörü ile uyarılmasını ve buna bağlı olarak Ras/Raf sinyal ileti yolağının aktivasyonu basamaklarını içerir. Bu da vulva indüksiyondan sorumlu iki adet transkripsiyon faktörünü (lin-1 ve Lin-31) fosforilleyecek olan ERK MAP kinazın aktivasyonunu sağlar.



Şekil 13.45 Hedgehog sinyal iletimi
Hedgehog polipeptidi, lipidlerin eklenmesi ile modifiye edilir ve hedef hücre yüzeyindeki Patched'e bağlanır. Bu Smoothened'un Patched tarafından baskılanmasını ve Smoothened'un bir hücre içi sinyal oluşturmasını sağlar. Smoothened ile sinyal iletimi, kinesin-ilintili bir protein olan Coastal tarafından, Fused denilen bir protein kinaz ile kompleks halinde mikrotübüle tutturulmuş Cubitis interruptus (Ci) transkripsiyon faktörü kompleksini tahrip eder. Bu komplekstеki Ci, genel transkripsiyon represörüne (Ci75) yıkılır. Kompleksin tahribi tam uzunluktaki Ci'nin (Ci155) hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive edeceği yer olan çekirdeğe geçişini sağlar.

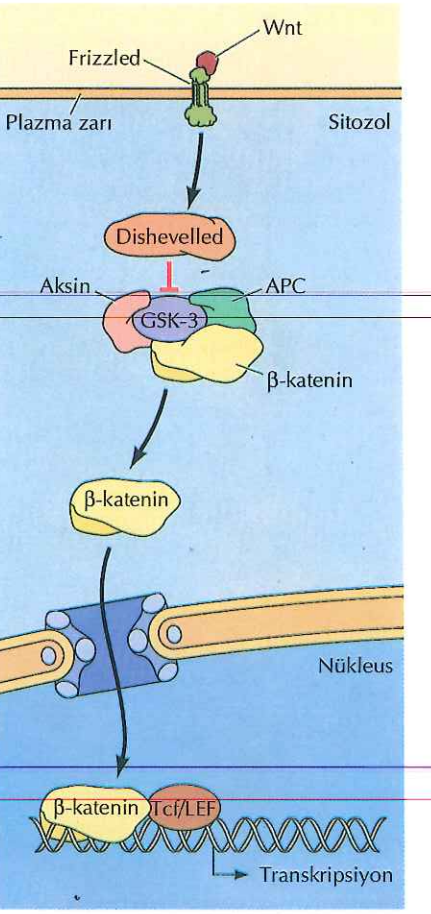
Hedgehog ve Wnt

Hedgehog ve **Wnt** yolakları, embriyo gelişimi sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar roller oynayan sinyal ileti sistemi ile yakından bağlantılıdır. Hedgehog ve Wnt yolaklarının her ikisi de ilk olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır, fakat Hedgehog ve Wnt ailelerinin üyeleri, hem omurgalı, hem de omurgasız embriyolarının gelişimi sırasında hücre şablonunun yapılanmasını sağlayan çok sayıda olayı kontrol ederler. Bu sinyal ileti yolakları tarafından düzenlenen süreçlere örnek olarak, hücre tipinin belirlenmesi ve organların, sinir sisteminin, iskeletin, akciğerlerin, saç, dişler ve gonadların gelişimi sırasındaki hücre şablonunun yapılanması sayılabilir.

Hedgehog genleri (birisi *Drosophila*'da ve üçü memelilerde), lipidlerin eklenmesi ile modifiye edilen salgılanan bir proteini kodlar. Hedgehog için fonksiyonel reseptör, Patched (=Yamalı) ve Smoothened (=Düzeltilmiş) olarak adlandırılan iki adet transmembran proteindir (Şekil 13.45). Hedgehog, Smoothened'ın negatif düzenleyicisi olan Patched'e bağlanır. Hedgehog'un Patched'e bağlanması Smoothened'ın bir hücre içi sinyal yaymasını sağlar. Smoothened'ın yedi adet transmembran α heliksi vardır ve yapısı G proteinleri ile eşleşen reseptörlere benzer (bkz. Şekil 13.10). Bununla birlikte, Smoothened ile bağlantılı bir G proteini bilinmemektedir ve Smoothened'dan sinyal iletimi mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Smoothened sinyal iletimi için hedef, *Drosophila*'da Cubitus interruptus (Ci) memelilerde Gli olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu faktör, Fused denilen bir protein kinaz ve Coastal denilen bir kinezin-ilişkili protein ile bir kompleks halinde bulunur. Smoothened sinyal iletimi olmadığında, bu kompleks Coastal'ın tübülin ile etkileşimi yoluyla mikrotübüller ile bağlantılıdır ve Ci'nin bir transkripsiyonel represörünün (Ci75) oluşumu için kesilir. Smoothened aktivasyonu bu kompleksin mikrotübüllerden ayrılmasına ve tam uzunluktaki Ci'nin (Ci155) hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive ettiği yer olan nükleusa geçişine yol açar. Ci hedef genleri arasında Wnt ailesi üyelerini kodlayan genlerin olması, Hedgehog ve Wnt sinyal ileti yolakları arasındali direkt bağlantıyı göstermesi açısından ilginçtir.

Wnt proteinleri, Frizzled ailesindeki reseptörlere bağlanan bir salgılanan büyüme faktörleri ailesidir (Şekil 13.46). Frizzled reseptörleri Smoothened ile ilişkilidir ve benzer bir şekilde G proteinleri ile eşleşip eşleşmediği bilinmeyen yedi transmembran α heliksi vardır. Frizzled sinyal iletimi Dishevelled denilen bir sitoplazmik proteinin fosforilasyonu ve bir protein kinaz olan glikojen sentaz kinaz-3'ün (GSK-3) inhibisyonuna yol açar. GSK-3 Bölüm 11'de aterens bağlantılardaki kaderin-aktin bağlantılarını sağlayan bir transmembran protein olarak tartışıldığı gibi, β-katenini fosforile eder ve yıkımını sağlar (bkz. Şekil 11.15). Kaderin-aktin bağlantısı, β-kateninin rollerinden yalnızca birisidir. Wnt sinyal iletiminde β-katenin, Tcf/LEF transkripsiyon faktörleri ailesi ile kompleks oluşturarak, gen ekspresyonunun direkt bir düzenleyicisi olarak rol oynar. β-katenin bağlanması Tcf/LEF ailesi üyelerinin transkripsiyonel represör aktivatörlerinden ayrılmasını sağlar ve hücre kaderini kontrol eden diğer hücre sinyal iletimi molekülleri ve bir çok transkripsiyon faktörünün ekspresyonuna yol açar.

Şekil 13.46 Wnt yolağı
Wnt polipeptidleri Frizzled ailesindeki hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Frizzled ile sinyal iletimi bir protein kinaz olan GSK-3'ün baskılanmasına yol açar, sonuçta β-katenin stabilize olur ve Tcf/LEF transkripsiyon faktörleri ile bir kompleks oluşturur. Bu durumda Tcf/LEF aile üyeli represörden aktivatöre dönüşür ve hedef genlerin ekspresyonunu uyarır.



Notch Sinyal İletimi

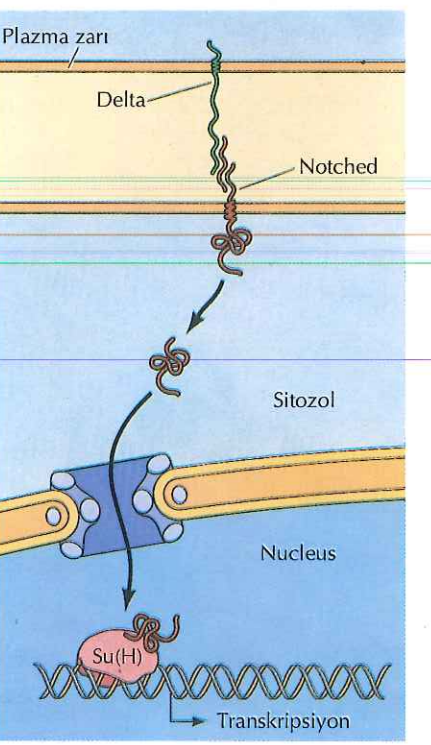
Notch yolağı hayvan gelişimi sırasında hücre kaderini kontrol eden, diğer bir, yüksek derecede korunmuş sinyal ileti yolağıdır. *Drosophila*'da R7 fotoreseptör nöronların farklılaşmasına yol açan diğer sinyal ileti yolakları gibi, Notch sinyal iletimi de, gelişim sırasında direkt hücre-hücre temasına bir örnektir. *Drosophila* ve *C.elegans*'dan insana kadar değişen organizmalarda, gelişimin her basamağında hücre proliferasyonu, sağkalımı ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görev yapar.

Notch, komşu hücrelerin yüzeyinde yerleşmiş transmembran proteinler (örn., Delta) ile, sinyal iletiminde reseptör olarak işlev gören, bir transmembran bölgesi olan büyük bir proteindir (Şekil 13.47). Notch uyarımı, yeni ve direkt bir transkripsiyonel aktivasyon yolağını başlatır. Özellikle ligand bağlanması, Notch'un proteolitik kesimine neden olur ve böylece Notch'un hücre içi bölümü çekirdeğe geçer. Notch'un hücre içi bölümü daha sonra *Drosophila*'da Su (H) memelilerde CSL denilen bir transkripsiyon faktörü ile bağlanır ve onu hedef genleri için bir represörden bir aktivatöre dönüştürür. Wnt sinyal ileti yolağında olduğu gibi, Notch hedef genleri de hücre kaderini belirleyecek diğer transkripsiyonel düzenleyici molekülleri kodlayan genleri içerir.

Programlanmış Hücre Ölümünün Düzenlenmesi

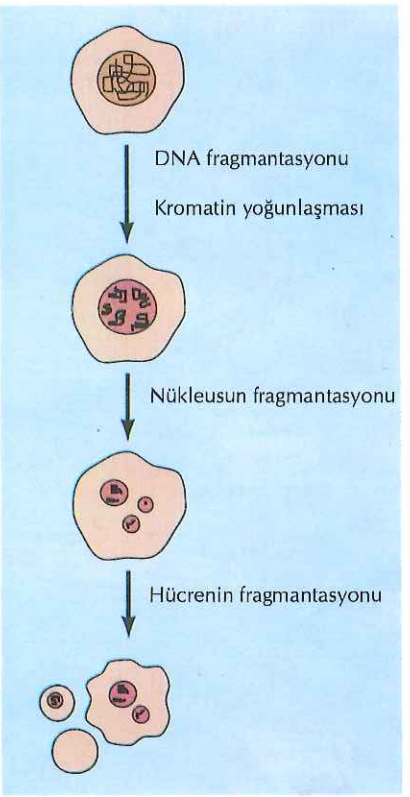
Programlanmış hücre ölümü, hücre ölümünün erişkin dokularının korunmasında ve embriyo gelişiminde anahtar rol oynayan normal fizyolojik bir biçimidir. Erişkinlerde, programlanmış hücre ölümü, hücre proliferasyonunun dengelenmesi ve dokularda var olan toplam hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin, kemik iliğindeki sürekli üretimi dengelemek için, insanlarda günlük $5x10^{11}$ kadar kan hücresi programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Ek olarak, programlanmış hücre ölümü organizmanın bir bütün olarak iyiliği için hasarlı ve tehlike potansiyeli olan hücrelerin ortadan kaldırılabilmesi yoluyla, bir savunma mekanizması sağlar. Virusla enfekte hücreler sıklıkla programlanmış hücre ölümüne girer, böylece yeni virus partiküllerinin oluşumu engellenir ve virusun konak organizma içinde yayılımı sınırlanır. DNA hasarı gibi diğer saldırılar da programlanmış hücre ölümünü uyarır. DNA hasarı durumunda, programlanmış hücre ölümü, kanser gelişimine yol açabilecek mutasyonları taşıyan hücreler gibi potansiyel zararlı mutasyonları taşıyan hücreleri ortadan kaldırabilir.

Gelişim sırasında, programlanmış hücre ölümü, birçok dokudaki istenmeyen hücrelerin elenmesinde anahtar rol oynar. Örneğin,

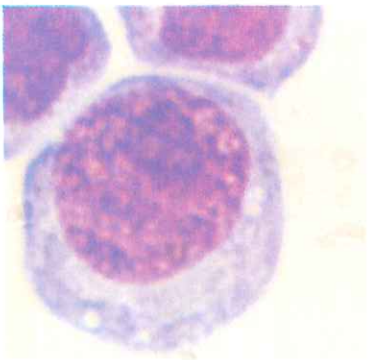


Şekil 13.47 Notch sinyal iletimi
Notch, komşu hücrelerin üzerindeki transmembran proteinler (örn., Delta) ile direkt hücre-hücre sinyal iletimi için, reseptör olarak görev yapar. Deltanın bağlanması Notch'un proteolitik kesimine yol açar, Notch'un hücre içi bölgesi salınır ve çekirdeğe geçer, bir transkripsiyon faktörü (Su (H) veya CSL) ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu uyarır.

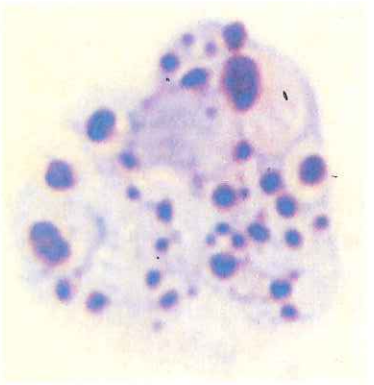
(A)



(B)



Normal



Apoptotik

programlanmış hücre ölümü, amfibi gelişimi sırasında larva dokusunun ortadan kaldırılması, el ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında, parmak aralarındaki dokunun ortadan kaldırılmasından sorumludur. Programlanmış hücre ölümünün bir diğer iyi tanımlanmış örneği memeli sinir sisteminin gelişiminden sağlanır. Nöronlar çok fazla miktarda üretilir ve gelişmekte olan sinir hücrelerinin yaklaşık %50'si programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Sağ kalanlar, hedef hücreleri ile doğru bağlantıları yapmış olmasına göre seçilir ve bunlar nöronal hücre ölüm programının bloklanması yoluyla, hücre sağ kalım sinyali olarak büyüme faktörleri salgılarlar. Hayvanlarda birçok diğer hücre tipinin sağ kalımı benzer bir şekilde, büyüme faktörlerine veya komşu hücreler, ya da hücre dışı matris ile temasa bağlıdır. Programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi, bazıları hücre ölümünü uyarıcı, bazıları hücre sağ kalımını sağlayan birçok farklı sinyal ileti yolağının entegre aktivitesi ile gerçekleştirilir.

Kaspazlar ve Apoptoz

Akut bir yaralanma sonucu hücrelerin kazara ölmesinin aksine, programlanmış hücre ölümü **apoptoz** olarak bilinen farklı morfolojik değişikliklerle karakterize aktif bir süreçtir (Şekil 13.48). Apoptoz sırasında kromozomal DNA, genelde nükleozomlar arasından, kesilmesi sonucunda parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır ve çekirdek o zaman küçük parçalara bölünür. Son olarak, hücre büzülür ve apoptotik cisimcikler denilen zarla çevrilmiş parçalara ayrılır. Bu gibi apoptotik hücreler ve hücre parçaları hem makrofajlar, hem de komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagosite edilir, böylece apoptoz ile ölen hücreler dokular tarafından etkin bir şekilde yokedilir. Buna karşın, akut yaralanma sonucunda ölen hücreler şişer ve patlar, hücre içerikleri hücre dışı ortama salınır ve inflamasyona neden olur.

C.elegans gelişimi sırasındaki programlanmış hücre ölümü çalışmaları ile, apoptozun düzenlenmesi ve gerçekleşmesinde anahtar roller oynayan üç gen ortaya çıkarılmıştır. Normal nematod gelişimi sırasında, toplam 1090 vücut hücresinin 131'i programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Apoptozun oluşması için iki gen, *ced-3* ve *ced-4*, gereklidir; eğer bu genlerden herhangi birisi inaktive edilecek olursa, normal programlanmış hücre ölümü gerçekleşemez. Üçüncü bir gen, *ced-9*, apoptozun negatif düzenleyicisi olarak iş görür. Eğer *ced-9* mutasyon ile inaktive edilirse, normalde sağ kalacak olan hücreler bunu gerçekleştiremez. Bunun yerine, bu hücreler de apoptoza girerler ve gelişmekte olan hayvanın ölümüne yol açarlar. Buna karşın, eğer *ced-9* anormal derecede yüksek düzeyde eksprese edilirse, normal programlanmış hücre ölümü oluşumu bozulur.

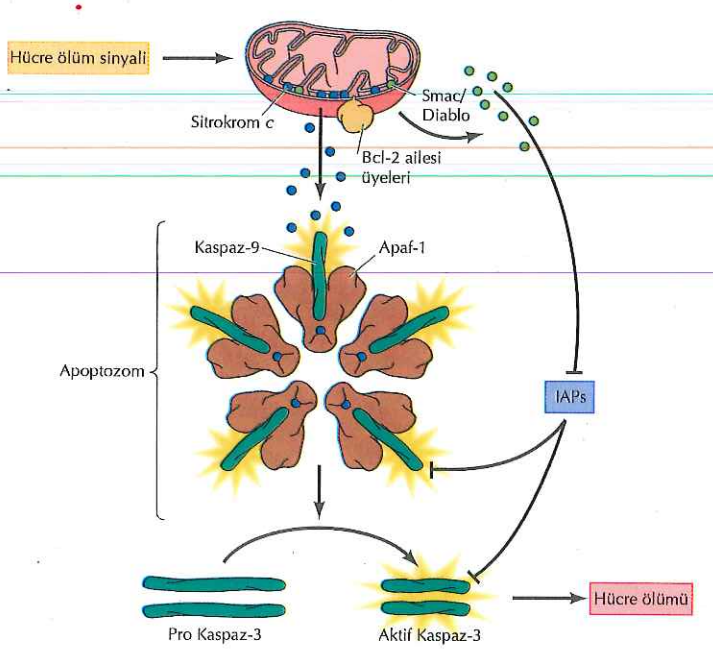
Memelilerde de *ced-3*, *ced- 4* ve *ced-9* ile ilişli genler tanımlanmıştır ve çok çeşitli uyaranlar tarafından indüklenen apoptozun, korunumlu efektör ve düzenleyicilerini temsil eden proteinleri kodladıkları bulunmuştur. Ced-3, bir düzineden fazla proteazı içeren, aktif bölgelerinde sistein (C) içerdiği ve sübstratı olan proteinleri aspartik asitten (Asp) sonra kestiği için **kaspazlar** olarak bilinen bir ailenin ilk tanımlanan üyesidir. Kaspazlar programlanmış hücre

Şekil 13.48 Apoptoz
Apoptoz olayının şematik görünümü. (B) Apoptotik ve normal insan lösemi hücreleri, apoptoz sırasındaki kromatin yoğunlaşmasını ve çekirdek parçalanmasını gösteren ışık mikroskobik görüntüleri (B, D.R. Green'in nazik katkılarıyla, La Jolla Allerji ve İmmünoloji Enstitüsü)

ölümünün en sondaki efektörü veya celladıdır, 100 kadar farklı hedef proteini keserek apoptoz olayına neden olur. Kaspazların ana hedefleri arasında bir DNaz inhibitörü yer alır, aktive edildiği zaman nükleer DNA'nın parçalanmasından sorumludur. Ek olarak kaspazlar, nükleer laminleri keserek, çekirdeğin parçalanmasına yol açar ve hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre isketinin tahribine, hücre zarının tomurcuklanmasına ve hücre parçalanmasına neden olur.

Kaspazlar, inaktif öncüller olarak sentezlenir, genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile aktif şekle dönüştürülür. Başlatıcı kaspazın aktivasyonu böylece aşağı yöndeki diğer kaspazların aktivasyonunu ve hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme reaksiyonu başlatır. Bu nedenle kaspazların düzenlenmesi, hücre sağ kalımının belirlenmesi için yaşamsaldır. Ced-4 ve memeli homoloğu (Apaf-1) kaspazlara bağlanır ve onların aktivasyonunu uyarır. Bunun tersine, Ced-9 kaspaz aktivasyonunu baskılar. Memeliler, Ced-9 ile ilintili **Bcl-2** ailesi olarak adlandırılan bir protein ailesi kodlarlar. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri, Bcl-2 nin kendisi de dahil, kaspaz aktivasyonu ve programlanmış hücre ölümü inhibitörleri olarak Ced-9'a benzer işlev görürler. Ancak, Bcl-2 ailesinin diğer üyeleri kaspaz aktivasyonunu uyarır ve programlanmış hücre ölümünü başlatır. Kaspazlar da **IAP** (*a*poptoz *p*roteinleri *i*nhibitörleri) denilen, apoptozu kaspaz aktivitesini direkt olarak baskılayarak engelleyen bir protein ailesi tarafından düzenlenir.

Memeli hücrelerinde, Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondride görev yapar ve programlanmış hücre ölümünün kontrolünde merkezi bir rol oynar (Şekil 13.49). Memeli hücrelerindeki anahtar başlatıcı kaspazlardan birisi (kaspaz-9) aktive edilir, *C.elegans*'daki Ced-3 gibi, Ced-4 homoloğu olan Apaf-1 ile kompleks oluşturur. Memelilerde bu kompleksin oluşumu, apoptozu tetikleyen uyarılar ile mitokondriden salınan sitokrom c'ye de ihtiyaç duyar. Hücre sağ kalımının normal koşulları altında, sitokrom c mitokondri zarları arasındaki boşlukta yerleşmiş iken (bkz. Şekil 10.8), Apaf-1 ve kaspaz-9 sitozolde bulunur, böylece kaspaz-9 inaktif kalır. Ancak, hücre ölümünü tetikleyen DNA



Şekil 13.49 Apoptozun düzenleyicileri ve efektörleri
Memeli hücrelerinde, apoptozu uyaran çoğu ölüm sinyali, mitokondri hasarının sonucunda, zarlar arasındaki boşluğa sitokrom c ve Smac/ Diablo gibi apoptoz öncülü diğer moleküller salınır. Mitokondri dış zarında yerleşen Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrinin bütünlüğünü sağlarlar. Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı Apaf-1 ve kaspaz-9 içeren, kaspaz 9'un aktive olduğu komplekslerin (apoptozom) oluşumuna neden olur. Daha sonra kaspaz-9 proteolitik kesim ile aşağı yöndeki kaspaz-3 gibi diğer kaspazları aktive eder. Smac/ Diablo kaspaz inhibitörleri olan IAP lerin aktivitesini engelleyerek hücre ölümünü uyarır.

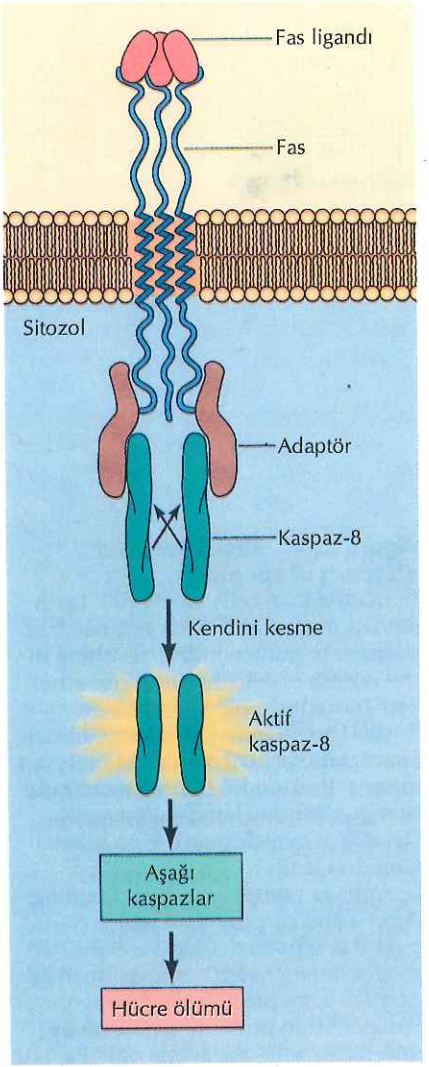
hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu gibi birçok uyarı, mitokondride hasara yol açar ve sitokrom c, sitozole salınır. Sitozolde sitokrom c Apaf-1'e bağlanır ve **apoptozom** denilen, çok alt üniteli Apaf-1/Kaspaz-9 kompleksini oluşumunu tetikler ve kaspaz-9 aktive edilir. O zaman kaspaz-9 aşağı yöndeki kaspaz-3 gibi diğer efektör kaspazları keser ve aktive eder ve nihayetinde hücre ölür. Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondri zarında, mitokondrinin bütünlüğünü ve sitokrom c salınımını düzenleyici rol oynarlar. Bcl-2 ailesinin apoptozu baskılayan üyeleri (Bcl-2'nin kendisi gibi) sitokrom c salınımını engeller, buna karşın Bcl-2'nin hücre ölümünü uyaran üyeleri, mitokondri hasarını, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu uyararak etki gösterirler. Mitokondri hasarı yalnızca sitokrom c'nin değil, apoptozu uyaran diğer moleküllerin de salınımı ile sonuçlanalanabilir. Bu moleküller, Smac/Diablo denilen IAP'lerin etkisini engelleyerek, kaspaz aktivitesini uyaran bir proteini içerir. Aşağıda da tartışılacağı gibi kaspazlar, Bcl-2 ailesi üyeleri ve IAP'ler memeli hücrelerinin sağ kalımını kontrol eden sinyal ileti yolaklarının kritik hedefleridir.

Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu

Aktive edilmiş reseptörler tarafından salgılanan, hedef hücrelerde apoptozu direkt olarak uyaran bazı polipeptidler, programlanmış hücre ölümü sinyalleridir. Bu hücre ölüm sinyalleri **tümör nekroz faktörü (TNF)** ailesine ait polipeptidlerdir. Bunlar, TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanırlar ve çok çeşitli hücre tiplerinde apoptozu uyarabilirler. Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerinden birisi, bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden, Fas denilen hücre yüzey reseptörüdür. Örneğin, Fas aktivasyonu ile uyarılan apoptoz, bağışık yanıtın sonunda arta kalan lenfositlerin ortadan kaldırılmasından, kanser hücreleri veya virus ile enfekte hücrelerin ölümüne kadar, bağışıklık sistemi hedef hücrelerinin ölümünden sorumludur.

Hücre ölüm reseptörleri kaspazları direkt aktive ederek apoptoz uyarırlar (Şekil 13.50). TNF ve ilgili aile üyeleri, üç identik polipeptid zincir içerirler ve bağlanmaları reseptör üçlenmesini uyarır. Reseptörlerin sitoplazma bölümü, kaspaz-8 denilen yukarı yöndeki bir kaspaza bağlanmayı sağlayacak olan adaptör molekülerle bağlanır. Bu, kaspaz-8'in kendi kendini kesmesi sonucunda aktivasyonuna yol açar ve aktif kaspaz-8 aşağı yöndeki diğer kaspazları aktive edebilir, böylece hücre ölümü ile sonuçlanacak olan bir kaspaz yolağı başlar.

Kaspaz-8 yalnızca diğer kaspazları kesmekle kalmaz, Bcl-2 ailesinin Bid denilen bir üyesini de keser. Bid, Bcl-2 ailesinin, apoptoza karşı koruyan değil, apoptozu uyaran bir üyesidir. Normalde, sitozolde inaktif formda kalır. Ancak, kaspaz-8 tarafından kesimi Bid'in, mitokondriye geçişine ve zarı parçalayarak sitozole sitokrom c salınmasına olanak sağlar. Bu kaspaz 9 aktivasyonuna yol açar, kaspaz yolağının daha da çok kuvvetlenmesi hücre ölüm reseptörlerinin kaspaz-8'i direkt olarak aktive etmesi ile başlatılır.



Şekil 13.50 Hücre ölüm reseptörleri
Fas reseptörünün ligandına bağlanması direkt kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozu uyarır. Fas ligandı üç polipeptid zinciri içerir, böylece bağlanması reseptör üçlenmesini uyarılır. Kaspaz-8 adaptör moleküller aracılığı ile reseptöre bağlanır ve böylece otokesimini aktive eder. Bu da aşağı yöndeki kaspazların aktivasyonuna ve hücre ölümüne yol açar.

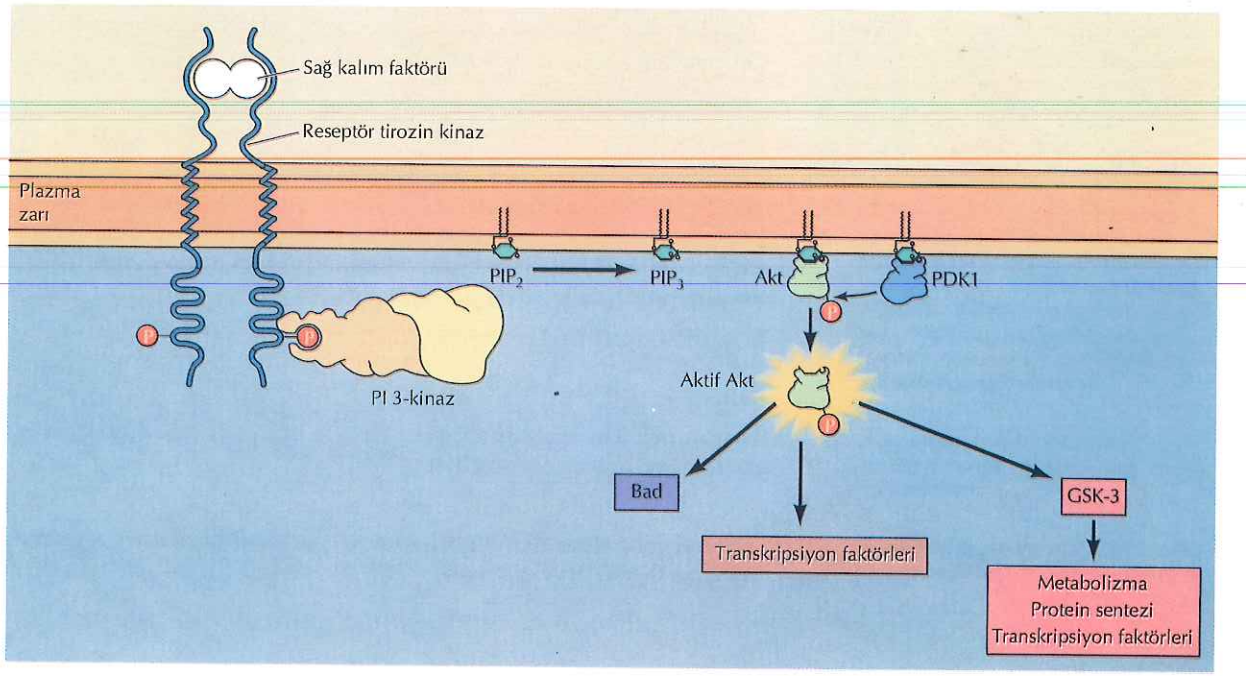
Hücre Sağkalım Sinyal İletimi

TNF ve ilgili polipeptidler ile sinyal iletimi, apoptoza neden olacak hücre ölüm reseptörlerini uyaran aktif bir süreçtir. Diğer sinyal ileti yolakları ters yönde etkileyerek, apoptozu engeller ve hücre sağ kalımını sağlar. Bu sinyal ileti yolakları, sağ kalımı, hücre dışı büyüme faktörlerine veya hücre-hücre etkileşimlerine bağlı olan birçok farklı hücrenin kaderini kontrol eder. Gerçekten de, yüksek ökaryotlardaki çoğu hücre, hücre ölümü diğer hücrelerden gelen sağ kalım sinyalleri ile aktif olarak engellenmezse, apoptoza gitmeye programlanmıştır.

Daha önce belirtildiği gibi, gelişimdeki programlanmış hücre ölümüne en iyi tanımlanmış örnek, omurgalı sinir sistemidir. Sinir hücrelerinin yaklaşık %50'si apoptoz ile ölür, hedef hücrelerinden yeterli miktarda sağ kalım sinyali alan hücreler sağ kalır. Bu sağ kalım sinyalleri, bir reseptör protein-tirozin kinazı aktive ederek, nöronların hem sağ kalımını hem de farklılaşmasını uyaran, sinir büyüme faktörü (NGF) ile ilintili büyüme faktörleridir. Diğer hücre tipleri de benzer bir şekilde, büyüme faktörlerine veya integrinler ile bağlantılı reseptör olmayan protein-tirozin kinazları aktive eden hücre-hücre temasına bağımlıdır.

Ana hücre içi sinyal iletimi yolaklarından birisi PI 3-kinaz enzimi ile başlatılan hücre sağ kalımının uyarılmasından sorumludur ve protein tirozin kinazlar ya da, G-proteini-eşlikli reseptörler tarafından aktive edilir. PI3-kinaz PIP_3 oluşumu için, bir zar fosfolipidi olan PIP_2'yi fosforiller, bu da bir protein-serin/tireonin kinaz olan Akt'ı aktive eder (bkz. Şekil 13.31). Böylece Akt apoptozu düzenleyen çok sayıda proteini fosforiller (Şekil 13.51). Akt'ın bir substratı Bcl-2 ailesinin Bad olarak adlandırılan bir üyesidir. Bad, Bcl-2 ailesinin bir diğer üyesi olan Bid gibi, mitokondriden sitokrom c salınımını uyararak hücre ölümüne neden olur. Akt tarafından Bad fosforilasyonu

Şekil 13.51 PI3-kinaz yolağı ve hücre sağ kalımı
NGF gibi sağ kalım faktörleri reseptör protein-tirozin kinazları aktive ederek, PI3-kinaz aktivasyonuna ve PIP_3 oluşumuna yol açarlar. PIP_3 Akt ın PDK1 tarafından fosforillenmesi sonucunda aktive edileceği yer olan plazma zarına yerleşimini sağlar. Bu durumda Akt hücre sağ kalımına katkıda bulunan birçok proteini fosforiller. Akt ın hedefleri apoptoz baskılayıcılarıdır. Bunlar arasında Bcl-2 ailesi üyesi Bad, birçok transkripsiyon faktörü ve hücre metabolizması ile protein sentezi kadar, ek transkripsiyon faktörlerini fosforillenmesini etkileyen bir protein kinaz olan GSK-3 yer alır.



sitozoldeki Bad grubu proteinler için bağlanma bölgesi yaratır, böylece Bad'ın mitokondri zarına geçişi engellenir. Akt aynı zamanda Bcl-2 ailesi üyelerini de içeren hedef genlerin ekspresyonunu kontrol ederek, hücre sağ kalımını düzenleyen çok çeşitli transkripsiyon faktörünü fosforiller. Ek olarak Akt, kendi hedef genlerinin hem transkripsiyonunu hem de translasyonunu düzenleyerek apoptozu etkileyen bir diğer protein kinazı (GSK-3) fosforiller. Bu yüzden PI 3-kinaz/Akt yolağı, Bcl-2 ailesi üyelerine ek olarak, IAP'leri ve düzenleyicilerini de içerebilen, aşağı yöndeki birçok hedef yoluyla hücre sağ kalımını düzenler.

Hücre sağ kalımı yalnızca PI 3-kinaz/Akt sinyal iletimi ile değil, aynı zamanda Ras/Raf/ERK yolağını da içeren diğer sinyal iletimleri ile düzenlenir. Bu yolaklardaki apoptozu engelleyen mekanizmalardan birisi, RSK denilen bir protein kinazın ERK tarafından fosforilasyonu ve aktivasyonu ile ilgilidir. Akt gibi, RSK da Bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ı fosforiller, böylece Bad hücre sağ kalım sinyal iletiminde PI3-kinaz/-Akt ve ERK yolaklarının çakışma bölgesi olarak görev yapar. Ek olarak, ERK ve RSK apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonlarını etkileyen transkripsiyon faktörlerini fosforiller. Bu yüzden hücre sağ kalımını kontrol eden sinyallerin ve mekanizmaların kontrolü, hala yanıt bekleyen birçok soru ile devam etmekte olan araştırmaların, en aktif ve heyecan verici alanlarından birisi olmayı sürdürmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

endokrin sinyal iletimi, hormon, parakrin sinyal iletimi, otokrin sinyal iletimi

steroid hormon, testosteron, östrojen, progesteron, kortikosteroid, glukokortikoid, mineralokortikoid, ekdizon, brasinosteroid, tiroid hormonu, D_3 vitamini, retinoik asid, retinoid, nükleer reseptör süperailesi

nörotransmiter

ÖZET

SİNYAL İLETİMİ MOLEKÜLLERİ VE RESEPTÖRLERİ

Hücre-Hücre Sinyal İletimi Tipleri: Çoğu sinyal iletimi molekülleri bir hücreden salınırlar ve hedef hücreleri tarafından eksprese edilen reseptörlerine bağlanırlar. Hücre-hücre sinyal iletimi, sinyalin katedeceği mesafe temel alınarak üç genel kategoride (endokrin, parakrin ve otokrin sinyal iletimi) incelenir.

Steroid Hormonlar ve Nükleer Reseptör Süperailesi: Steroid hormonlar, tiroid hormon, D_3 vitamini ve retinoik asid, hedef hücrelerinin plazma zarından difüze olan ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanan, küçük, hidrofobik moleküllerdir. Nükleer reseptörler süperailesi üyeleri ligand bağlanmasına yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görürler.

Nitrik Oksid ve Karbon Monoksid: Basit bir gaz olan nitrik oksid ve karbon monoksid sinir sisteminde ve diğer hücre tiplerinde önemli sinyal iletimi molekülleridir.

Nörotransmiterler (Sinirsel İleticiler): Sinirsel ileticiler sinaps yapan sinir hücreleri arasındaki veya sinir hücreleri ile bir diğer hedef hücreler arasındaki sinyalleri taşıyan küçük hidrofobik moleküllerdir.

Peptid Hormon ve Büyüme Faktörleri: Hayvanlarda en geniş çeşitliliğe sahip sinyal iletimi molekülleri peptidlerdir, boyutları yalnızca birkaç aminoasitten yüz amino aside kadar değişebilir. Bu grup moleküller peptid hormonları, nörotransmiterleri ve büyüme faktörlerini içerir.

peptid hormon, nöropeptid, enkefalin, endorfin, sinir hormonu, sinir büyüme hormonu (NGF), epidermel büyüme faktörü (EGF), platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), sitokin, zara-tutunmuş büyüme faktörü

Ökosanoid: Ökosanoidler parakrin ve otokrin sinyal iletimi fonksiyonu gören bir grup lipiddir.

ökosanoidler, prostoglandin, prostasiklin, tromboksan, lökotrien

Bitki Hormonları: Bitki hormonu olarak bilinen küçük moleküller bitki büyüme ve gelişimini düzenlerler.

Bitki hormonları, oksin, gibberelin, sitokinin, absisik asit, etilen

HÜCRE YÜZEY RESEPTÖRLERİNİN FONKSİYONLARI

G-Proteini-Eşlikli Reseptörler: Hücre yüzey reseptörlerinin çoğu hormon reseptörlerini ve nörotransmiterleri için reseptörleri içeren büyük bir grubu, sinyalleri hücre içi hedeflere G proteinleri aracılığı ile iletirler.

G proteini, G-proteini-eşlikli reseptörler, heterotrimerik G proteinleri

Reseptör Protein-Tirozin Kinazlar: Çoğu büyüme faktörünün reseptörleri, protein-tirozin kinazlardır.

reseptör protein-tirozin kinazlar, otofosforilasyon, SH2 bölgesi, PTB bölgesi

Sitokin Reseptörleri ve Resepör Olmayan Protein-Tirozin Kinazlar: Çoğu sitokin reseptörleri, reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ile bağlanarak etki gösterir.

sitokin reseptör süperailesi, reseptör olmayan protein-tirozin kinaz, Janus kinaz (JAK), Src

Diğer Enzimatik Aktiviteler ile Bağlantılı Reseptörler: Diğer thücre yüzey reseptörler tipleri protein-tirozin fosfatazları, protein serin/tireonin kinaz, guanilil siklazı içerir.

protein-tirozin fosfatazlar, transforme edici büyüme faktörü β (TGFβ), protein serin/treonin kinaz, guanilil siklaz

HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİMİ YOLAKLARI

Siklik AMP yolağı : İkinci Mesajcılar ve Protein Fosforilasyonu: Siklik AMP, hayvan hücrelerinin çok çeşitli hormonlara ve kokulara yanıt vermesinde önemli bir ikinci mesajcıdır. cAMP nin çoğu etkileri, hem metabolik enzimleri hem de CREB denilen transkripsiyon faktörünü fosforilleyen protein kinaz A tarafından düzenlenir.

hücre içi sinyal iletimi, siklik AMP (cAMP), ikinci mesajcı, adenilil siklaz, cAMP fosfodiesteraz, cAMP-bağımlı protein kinaz (protein kinaz A), cAMP yanıt elemanı (CRE), CREB

Siklik GMP: Siklik GMP de hayvan hücrelerinde bulunan bir diğer önemli ikinci mesajcıdır. En iyi tanımlanmış rolü omurgalı gözündeki görsel algılamadadır.

siklik GMP(cGMP), rodopsin, transdüsin, cGMP, fosfodiesteraz

Fosfolipidler ve Ca^{2+}: Fosfolipidler ve Ca^{2+}, hem G proteinleri ile eşleşmiş reseptörlerin hem de protein-tirozin kinazların aşağı yönünde aktive olan genel bir ikinci mesajcılardır. Fosfatidil inozitol 4,5-bifosfat (PIP_2) hidrolizi sonucunda diaçilgliserol ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) elde edilir ve bunlar sırasıyla protein kinaz C yi aktive ederler ve hücre içi depolardaki Ca^{2+} nin hareketini sağlarlar. Sitozolik Ca^{2+} nin düzeyinin artması sonucunda Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı protein kinazları da içeren çok sayıda hedef protein aktive olur. Sinir ve kas hücreleri gibi elektriksel uyarılara yanıt verebilen hücrelerde plazma zarındaki voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının ve endoplazmik retikulum ya da sarkoplazmik retikulumdaki riyanodin

fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat (PIP_2), fosfolipaz C, diaçilgliserol, inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3), protein kinaz C, forbol ester, kalmodulin, CaM kinaz, riyanodin reseptörü, fosfatidilinozit(PI),3-kinaz, fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP_3), Akt

reseptörlerinin açılması ile sitozoldeki Ca^{2+} düzeyi artar. Ek olarak diaçil gliserol ve IP_3'a kesilecek olan PIP_2 fosforile olarak farklı bir ikinci mesajcı olan PIP_3'e dönüşebilir. Bu da hücre sağkalımında anahtar öneme sahip bir protein-serin/tireonin kinaz olan Akt'ın aktivasyonuna yol açar.

MAP kinaz, ERK, Ras, Raf, MEK, guanin nükleotid değişim faktörü, GTPaz-aktive edici protein, küçük GTP-bağlayıcı protein, acil-erken gen, serum yanıt elemanı(SRE), serum yanıt faktörü (SRF), Elk-1, yapı iskele proteinleri

Ras, Raf ve MAP Kinaz Yolakları: MAP kinaz yolağı çok sayıda hücre dışı sinyallerin aşağı yönünde aktive edilen korunmuş bir protein kinazlar zinciridir. Hayvan hücrelerinde en iyi tanımlanmış MAP kinaz tipleri küçük GTP-bağlayan protein Ras aracılığıyla büyüme faktörü reseptörleri ile eşleşir ve MAP kinaz (ERK) aktivasyonuna neden olan bir protein kinaz yolağını başlatır. Böylece ERK sitozoldeki ve çekirdekteki acil erken gen uyarımlarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok proteini fosforile eder. Bazı diğer MAP kinaz yolakları memeli hücrelerinde inflamasyon ve strese yanıtını düzenlerler. MAP kinaz yolağının elemanları MAP kinaz yolağının spesifitesinin belirlenmesinde önemli rol oynayan yapı iskele proteinleri tarafından organize edilir.

JAK/STAT yolağı, STAT proteini

JAK/STAT Yolağı: STAT proteinler SH2 bölgesi içeren ve sitokinler veya büyüme faktörleri ile bağlantılı protein-tirozin kinazlar tarafından doğrudan aktive edilen transkripsiyon faktörleridir.

SİNYAL İLETİMİ VE HÜCRE İSKELETİ

FAK

İntegrinler ve Sinyal İletimi: İntegrinlerin hücre dışı matrise bağlanması reseptör olamayan protein-tirozin kinazlar olan FAK ve Src'ı uyarır ve fosfolipaz C, PI 3-kinaz ve Ras/Raf/ERK sinyal iletimi yolaklarının aktivasyonuna neden olur.

Rho, Rac, Cdc42

Aktin Hücre İskeletinin Düzenlenmesi: Büyüme faktörleri, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi yoluyla hücre hareketi ve hücre şekil değişikliklerini uyarırlar. Bu hücre iskeleti değişiklikleri, Rho ailesi küçük GTP-bağlayan proteinler ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir.

GELİŞİM VE FARKLILAŞMADA SİNYAL İLETİMİ

Drosophila *ve* C.elegans *'daki Reseptör Tirozin Kinaz/Ras/Raf/ERK yolağı:* Ras/Raf/ERK yolağının gelişimdeki rolü *Drosophila*'daki sinir hücre fotoresetörlerinin farklılaşması ve *C.elegans*'daki vulval uyarı çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır.

Hedgehog, Wnt

Hedgehog ve Wnt: Hedgehog ve Wnt sinyal ileti yolakları hücre kaderinin belirlenmesinde ve hem omurgalılar hem de omurgasızlarda embriyo gelişimi sırasındaki kalıbın belirlenmesinde anahtar roller oynarlar.

Notch

Notch Sinyal İletimi: Notch yolağı hayvan gelişimi sırasında doğrudan hücre-hücre etkileşimleri ile hücre kaderini kontrol eder.

PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜN DÜZENLENMESİ

programlanmış hücre ölümü, apoptoz, kaspaz, Bcl-2, IAP, apoptozom

Kaspazlar ve Apoptoz: Programlanmış hücre ölümü hem erişkin dokularının devamlılığının sağlanmasında, hem de embriyo gelişiminde arnahtar rol oynar. Akut yaralanmalardaki kaza sonucu hücre ölümünün aksine, programlanmış hücre ölümü aktif bir süreç olan apoptoz ile gerçekleşir. Apoptozun düzenlenmesi ve gerçekleştirilmesinden sorumlu genler insandan *C.elegans*'a kadar korunmuştur. Hücre ölüm mekanizmasının elemanları apoptozun efektörleri oldukları kadar kaspaz aktivasyonunu düzenleyen proteinler olarak da bilinen bir proteaz ailesini (kaspazlar) içerir. Memeli hücrelerinde kaspaz aktivasyonunun başlatılmasında, mitokondriden sitokrom c salınımı anahtar rol oynar.

Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu: Salgılanan bazı polipeptidler kaspazlar ile doğrudan ilişkili reseptörleri aktive ederek, programlanmış hücre ölümünü uyarırlar.

Hücre Sağkalım Sinyal İletimi: Çoğu hücrede apoptozun baskılanması, salgılanana faktörlerden veya hücre-hücre temasından gelen sağkalım sinyallerine bağımlıdır. PI3-kinaz/Akt yolağı hücre sağkalımını uyarmaktan sorumlu ana sinyal iletimi yolağıdır.

tümör nekroz faktörü (TNF)

Sorular

1. Parakrin sinyal iletiminin, endokrin sinyal iletiminden farkı nedir?

2. Çoğu hücre tipi hücre proliferasyonunu uyarmak için neden otokrin sinyal iletimini kullanmaz?

3. Steroid hormonlar gibi hidrofobik sinyal iletimi molekülleri ile, protein hormonlar gibi hidrofilik sinyal molekülleri sinyal iletimi arasında nasıl bir fark vardır?

4. Aspirinin inflamasyonu ve kan pıhtılaşmasını azaltıcı etkisi nasıl gerçekleşir?

5. Tiroid hücrelerinin proliferasyonu G_s ile eşleşen bir reseptörü aktive eden hormonlar ile uyarılır. cAMP fosfodiesteraz inhibitörleri bu hücrelerin proliferasyonunu nasıl etkiler?

6. Epinefrin reseptörü G_s ile eşleşir, buna karşın asetilkolin reseptörü (kalp kası hücrelerindeki) G_i ile eşleşir. Epinefrin reseptörünün hücre dışı dizisini, asetilkolin reseptörünün sitozoldeki dizisi ile birleştirerek rekombinant bir molekül yapacağınızı varsayalım. Bu rekombinant molekülü eksprese eden hücrelerde epinefrinin cAMP düzeyi üzerine etkisi ne olabilir? Asetilkolinin etkisinin ne olmasını beklersiniz?

7. Trombosit-kökenli büyüme faktörü (PDGF) iki polipetid zincirinden oluşan bir dimerdir. PDGF reseptör sinyal iletiminde, PDGF monomerinin etkisinin ne olacağını düşünürsünüz?

8. Büyüme faktöründen bağımsız (yani büyüme faktörü ile uyarılmasa bile hücre içi aktivitesi sürekli açık olan) bir reseptör tirozin kinazı eksprese eden tümör hücrelerinin büyümesini engelleyebileceği öngörüsüyle, bu reseptörün tirozin kinaz bölgesi eksik ancak diğer tüm bölgeleri tamam olan kesilmiş bir versiyonunu oluşturdunuz. Bu kesilmiş reseptörü eksprese ettiğiniz zaman hem normal hücrelerin hem de tümör hücrelerinde dominant negatif etkili olduğu ve tüm hücrelerin proliferasyonunu durdurduğunu belirlediniz. Bu sonucu açıklayınız.

9. Hücrelerdeki cAMP artışının genleri nasıl aktive edebileceğini açıklayınız.

10. Protein fosfataz 1 overekspresyonu, uygun hedef hücrelerin hormon stimülasyonuna yanıt olarak cAMP-ile uyarılabilir genlerin uyarılmasını nasıl etkileyecektir? Protein fosfataz 1 koku algılanması ile ilişkili cAMP-kapılı iyon kanallarının fonksiyonunu nasıl etkileyecektir?

11. Çok hücreli organizmalarda apoptoz ile ölen hücrelerin, nekroz veya akut yaralanma sonucunda ölen hücrelere göre ne gibi avantajları vardır?

12. Mitokondri dış zarına proteinlerin zardan geçişine izin verecek kadar büyük bir poru oluşturan kompleksi enjekte etmenin hücreler üzerindeki etkisi ne olabilir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Sinyal İletim Molekülleri ve Reseptörleri

Arai, K., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai and T. Yokota. 1990. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783-836. [R]

Baranano, D. E. and S. H. Snyder. 2001. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10996-11002. [R]

Burgess, W. H. and T. Maciag. 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58:575-606. [R]

Carpenter, G. and S. Cohen. 1990. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265: 7709-7712. [R]

Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-1870. [R]

Denninger, J. W. and M. A. Marletta. 1999. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 334-350. [R]

Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875. [R]

Jessell, T. M. and E. R. Kandel. 1993. Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell 72/Neuron* 10 (Suppl.): 1-30. [R]

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162. [R]

Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83: 835-839. [R]

Massagué, J. and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 515-541. [R]

Mayer, B. and B. Hemmens. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22: 477-481. [R]

McCarty, D. R. and J. Chory. 2000. Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103: 201-209. [R]

McDonnell, D. P. and J. D. Norris. 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 1642-1644. [R]

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-474. [R]

Ross, R., E. W. Raines and D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155-169. [R]

Sheen, J, 2002. Phosphorelay and transcriptional control in cytokinin signal transduction. *Science* 296:1650-1652. [R]

Smalley, W. and R. N. DuBois. 1997. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv. Pharmacol.* 39:1-20. [R]

Snyder, S. H., S. R. Jaffrey and R. Zakhary. 1998. Nitric oxide and carbon monoxide: Parallel roles as neural messengers. *Brain Res. Rev.* 26:167-175. [R]

Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683. [R]

Thummel, C. S. and J. Chory. 2002. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. Genes Dev. 16: 3113-3129. [R]

Hücre Yüzey Reseptörlerinin Fonksiyonları

Aaronson, D. S. and C. M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655. [R]

Attisano, L. and J. L. Wrana. 2002. Signal transduction by the TGF-β superfamily. *Science* 296:1646-1647. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411:355-365. [R]

Burke, D., D. Wilkes, T. L. Blundell and S. Malcolm. 1998. Fibroblast growth factor receptors: Lessons from the genes. *Trends Biochem. Sci.* 23:59-62. [R]

Hubbard, S. R., M. Mohammadi and J. Schlessinger. 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273:11987-11990. [R]

Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad Sci.* USA 77:1311-1315. [P]

Massagué, J., S. W. Blain, and R. S. Lo. 2000. TGF-β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309. [R]

Mombaerts, P. 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286: 707-711. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. [R]

Rodbell, M. 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284:17-22. [R]

Sasaki, T., J. Sasaki-Irie and J. M. Penninger. 2001. New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:1041-1046. [R]

Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225. [R]

Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110: 669-672. [R]

Singer, A. L. and G. A. Koretsky 2002. Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science* 296:1639-1640. [R]

Thomas, S. M. and J. S. Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 513-609. [R]

Watowich, S. S., H. Wu, M. Socolovsky, U. Klingmuller, S. N. Constantinescu and H. F. Lodish. 1998. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:91-128. [R]

Wedel, B. and D. Garbers. 2001. The guanylyl cyclase family at Y2K. *Ann. Rev. Physiol.* 63:

215-233. [R]

Hücre İçi Sinyal İletim Yolakları

Aaronson, D. S. and C. M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655. [R]

Brivanlou, A. H. and J. E. Darneli Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295: 813-818. [R]

Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657. [R]

Chang, L. and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40. [R]

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80:259-268. [R]

Cohen, P. T. W. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: Variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* 22: 245-251. [R]

Corcoran, E. E. and A. R. Means. 2001. Defining Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975-2978. [R]

Darnell, J. E. Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635. [R]

Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three *Akts. Genes Dev.* 13: 290-2927. [R]

Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell 103: 239-252. [R]

Dhillon, A. S. and W. Kolch. 2002. Untying the regulation of the Raf-1 kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 404: 3-9. [R]

Divecha, N. and R. F. Irvine. 1995. Phospholipid signaling. *Cell* 80:269-278. [R]

Hill, C. S. and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211. [R]

Houslay, M. D. and G. Milligan. 1997. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem. Sci.* 22: 217-224. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236. [R]

Hurley, J. H. 1999. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274: 7599-7602. [R]

Johnson, G. L. and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912. [R]

Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter and H. R. De Jonge. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 307-312. [R]

Lowy, D. R. and B. M. Willumsen. 1993. Function and regulation of Ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62:851-891. [R]

Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934. [R]

Montminy, M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 807-823. [R]

Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639. [R]

Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614. [RI

O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber. 2002. Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109: S121-S131. [R]

Pawson, T. and J. D. Scott. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080. [R]

Ree, S. G. and Y. S. Bae. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272:5045-15048. [R]

Scheid, M. P. and J. R. Woodgett. 2001. PKB/Akt: Functional insights from genetic models. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 760-768. [RJ

Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg. 1999. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 821-861. [R]

Soderling, T. R. 1999. The Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.* 24:232-236. [R]

Stryer, L. 1991. Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* 266:10711-10714. [R]

Taylor, C. W. 2002. Controlling calcium entry. *Cell* 111: 767-769. [R]

Toker, A. and A. C. Newton. 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188. [R]

Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, R. L. Patterson, H.-T. Ma and D. L. Gill. 2002. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell. Biol.* 4: E263-272. [R]

Vojtek, A. B. and C. J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 19925-19928. [R]

Yarfitz, S. and J. B. Hurley. 1994. Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 269: 14329-14332. [R]

Sinyal İletimi ve Hücre İskeleti

Giancotti, F G. and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032. [R]

Etienne-Manneville, S. and A. Hall. 2002. Rho GTPases in *cell* biology. *Nature* 420:

629-635. [R]

Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687. [R]

Miranti, C. K. and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol.* 4: E83-E90. [R]

Nobles, C. D. and A. Hall. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of muitimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62. [P]

Ridley, A. J. 2001. Rho family proteins: coordinating cellular responses. *Trends Cell Biol.* 11: 471-47. [R]

Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nature Cell Biol.* 4: E65-E68. [R]

Gelişim ve Farklılaşmada Sinyal İletimi

Allman, D., J. A. Punt, D. J. Izon, J. C. Aster and W. S. Pear. 2002. An invitation to T and more: Notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* 109: S1-S11. [R]

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776. [R]

Bray, S. and M. Furriois. 2001. Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. *Curr. Biol.* 11: R217-R221. [R]

Dickson, B. 1995. Nuclear factors in Sevenless signalling. *Trends Genet.* 11:106-111. [R]

Ingham, P. W. 2001. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* 294:1879-1881. [R]

Kalderon, D. 2002. Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 12: 523-531. [R]

Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through β-catenin. *Science* 296:1644-1646. [R]

Simon, M. A. 2000. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103:13-15. [R]

Sternberg, P. W. and M. Han. 1998. Genetics of RAS signaling in *C. elegans*. *Trends Genet.* 14: 466-472. [R]

Taipale, J. and P. A. Beachy 2001, The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]

Thomas, B. J. and D. A. Wassarman. 1999. A fly's eye view of biology. *Trends Genet.* 15: 184-190. [R]

Wang, M. and F. W. Sternberg. 2001. Pattern formation during *C. elegans* vulval induction. *Curr. Top. Dev. Biol.* 51: 189-220. [R]

Wodarz, A. and R. Nusse. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:59-88. [R]

Zipursky, S. L. and G. M. Rubin. 1994. Determination of neuronal cell fate: Lessons from the R7 neuron of *Drosophila*. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:373-397. [R]

Programlanmış Hücre Ölümünün Düzenlenmesi

Adams, J. M. and S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26: 61-66. [R]

Adrain, C. and S. J. Martin. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* 26: 390-397. [R]

Ashkenazi, A. and V. M. Dixit. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308. [R]

Brunet, A., S. R. Datta and M. E. Greenberg. 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 297-305. [R]

Chen, G. and D. V. Goeddel. 2002, TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635. [R]

Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev.* 13:290-2927. [R]

Frame, S. and P. Cohen. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery *Biochem. J.* 359:1-16. [R]

Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899-1911. [R]

Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776. [R]

Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354. [R]

Martin, S. J. 2002. Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. *Cell* 109: 793-796. [R]

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365. [R]

Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9: 459-470. [R]

Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer. 1999. Cell death in development. *Cell* 96:245-254. [R]

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636. [R]

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15: 2922-2933. [R]

Bölüm 14 Hücre Döngüsü

Ökaryot Hücre Döngüsü 591

Hücre Döngüsü Gelişiminin Düzenleyicileri 599

M Evresi Olayları 608

Mayoz ve Döllenme 615

Kök Hücreler ve Erişkin Dokuların Korunması 621

ANAHTAR DENEY: MPF'nin Keşfi 600

ANAHTAR DENEY: Embriyonik Kök Hücre Kültürü 622

HÜCRELERİN OLASILIKLA EN TEMEL KARAKTERİSTİK ÖZELLİĞİ, tüm canlı organizmalar için söylenebileceği gibi, kendi başlarına üremeleridir. Bütün hücreler, hücre bölünme döngüsünün her tamamlanışında, bir ana hücreden iki yavru hücre oluşturmak üzere ikiye bölünerek ürerler. Yeni oluşan bu yavru hücreler de kendi başlarına büyür ve bölünür, böylelikle tek bir ana hücreden ve yavrularından büyüme ve bölünme ile yeni hücreler oluşur. Bu büyüme ve bölünme döngüleri, tek bir bakterinin, agar besi yerinde bir gecelik inkübasyon süresince, milyonlarca yavru hücre içeren bir koloni oluşturmasını mümkün kılar. Daha karmaşık olarak, tek bir döllenmiş yumurta, tekrarlanan büyüme ve bölünme döngüleri sonucunda, insan vücudunu meydana getirecek 10^{13} den fazla hücre oluşturur.

Tüm hücrelerde bölünme, yavruların eksiksiz genoma sahip olmasını sağlamak için, hücre büyümesi ve DNA replikasyonu dikkatle denetlenmelidir. Ökaryot hücrelerde hücre döngüsü süreci, mayalardan memelilere kadar korunmuş olan bir seri protein kinaz tarafından kontrol edilir. Yüksek ökaryotlarda hücre döngüsü mekanizması, hücrelerin, çoğalmasını denetleyen büyüme faktörleri tarafından, organizmanın bir bütün olarak gereksinimleri doğrultusunda hücre bölünmesine imkan vererek düzenlenir. Hücre döngüsü regülasyonundaki bozuklukların, kanser hücrelerinin anormal çoğalmasının başlıca nedeni olması şaşırtıcı değildir. Bu yüzden, hücre döngüsü ve kanser çalışmaları, Bölüm 13'de tartışılan, kanser ile hücre sinyal yolaklarının incelenmesi arasındaki ilişkiye benzer şekilde, birbiriyle yakından ilişkilidir.

Ökaryot Hücre Döngüsü

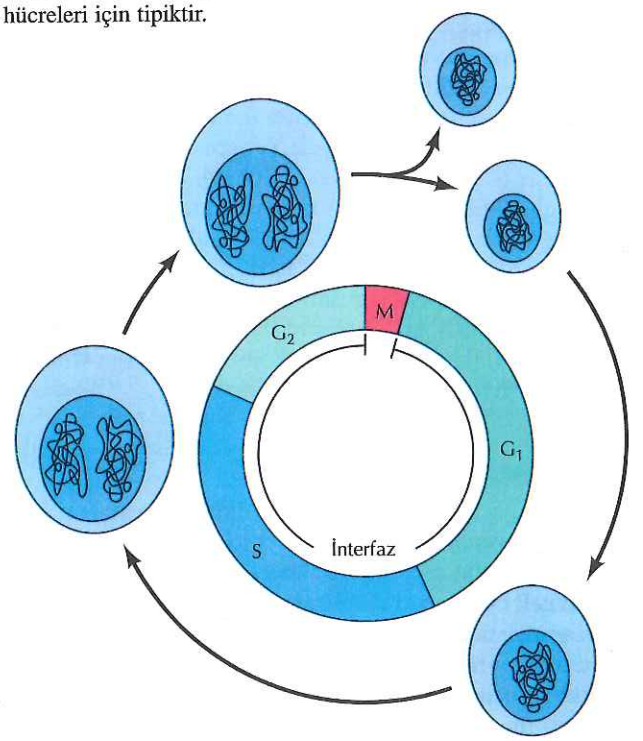
Hücrelerin çoğunda bölünme döngüsü birbiri ile bağlantılı dört süreçten oluşur: hücre büyümesi, DNA replikasyonu, iki katına çıkan kromozomların yavru hücrelere dağılması ve hücre bölünmesi. Bakterilerde hücre büyümesi ve DNA replikasyonu, hücre döngüsünün büyük bölümünde devam eder ve eşleşmiş kromozomlar yavru hücrelere, plazma zarı ile birlikte dağılır. Ökaryotlarda ise hücre

döngüsü, farklı dört evreden oluşur ve daha karmaşıktır. Hücre büyümesi, her ne kadar, genellikle kesintisiz bir süreç ise de, DNA hücre döngüsünün sadece bir evresinde sentezlenir ve daha sonra kopyalanmış kromozomlar hücre bölünmesi öncesi bir dizi karmaşık olayla yavru çekirdeklerine dağıtılır. Hücre döngüsünün bu basamakları, korunmuş bir denetleyici sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistem sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını düzenlemekle kalmaz, hücre döngüsünün, hücre çoğalmasını kontrol eden hücre-dışı sinyallerle bağlantısını da sağlar.

Hücre Döngüsünün Evreleri

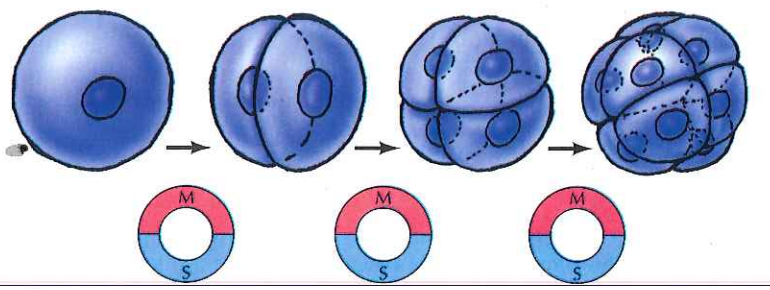
Tipik bir ökaryot hücre döngüsü, kültür ortamında yaklaşık her 24 saatte bir bölünen insan hücreleri ile gösterilmiştir. Mikroskopta gözlendiğinde, hücre döngüsü, **mitoz** ve **interfaz** olarak iki temel bölüme ayrılır. Hücre döngüsünün en etkileyici evresi, yavru kromozomların birbirinden ayrıldığı ve hücre bölünmesi **(sitokinez)** ile sonlanan mitoz (çekirdek bölünmesi) evresidir. Ancak, mitoz ve sitokinez sadece bir saat sürer, hücre döngüsünün %95'i interfazda (mitozlar arası dönem) geçer. İnterfaz sırasında kromozomlar yoğunluğunu kaybeder ve nükleus içine yayılırlar ve nükleus morfolojik olarak homojen görünür. Moleküler düzeyde ise interfaz, hücre büyümesi ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği, bölünmeye hazırlık aralığıdır.

Hücre, interfaz süresince sabit hızda büyür ve bölünen hücrelerin çoğu bir mitozdan diğerine hacim olarak iki katına çıkar. Bunun aksine, DNA interfazın sadece bir bölümünde sentezlenir. DNA sentezinin zamanlaması, ökaryot hücre döngüsünü dört farklı evreye böler (Şekil 14.1). Döngünün **M evresi,** genellikle sitokinez ile devam eden mitozdur. Bu evreyi, mitoz ile DNA replikasyonunun başlaması arasındaki süreci oluşturan **G_1 evresi** (gap 1) izler. Hücre, G_1 boyunca metabolik olarak aktiftir ve DNA'sını kopyala-maksızın sürekli büyür. G_1 evresini, DNA replikasyonunun yer aldığı **S evresi** (sentez) izler. DNA sentezinin tamamlanmasını, hücre büyüme-sinin devam ettiği ve mitoza hazırlık için proteinlerin sentezlendiği **G_2 evresi** (gap 2) izler.



Şekil 14.1 Hücre döngüsünün evreleri
Ökaryot hücrelerin çoğunun bölünme döngüsü dört farklı evreye ayrılır: M, G_1, S ve G_2. M evresini (mitoz) genellikle sitokinez izler. S evresi DNA replikasyonunun gerçekleştiği dönemdir. Hücre, G_1, S ve G_2 yi kapsayan interfaz boyunca büyür. Burada verilmiş olan, hücre döngüsü evrelerinin göreli uzunlukları, hızlı çoğalan memeli hücreleri için tipiktir.

Farklı hücre tiplerinde bu hücre döngüsü evrelerinin süreleri önemli oranda değişir. Toplam döngü süresi 24 saat olan ve hızlı çoğalan tipik bir insan hücresi için, G_1 evresi 11 saat, S evresi sekiz saat, G_2 evresi dört saat ve M bir saat civarındadır. Diğer hücre tipleri ise çok daha hızlı bölünebilir. Örneğin; tomurcuklanan mayalar, hücre döngü-sünü sadece 90 dakikada tamamlar. Hücre döngüleri, yumurta döllenmesinin hemen ardından erken embriyo hücrelerinde daha da kısadır (30 dakika veya daha az) (Şekil 14.2). Hücre büyümesi gerçekleşmeden devam eden erken embriyonik hücre döngüleri, yumurta sitoplaz-masını hızla daha küçük hücrelere böler. DNA replikasyonunun M evresi ile dönüşümlü çok kısa S evrelerinde gerçekleştiği embriyonik hücre döngülerinde G_1 veya G_2 evreleri yoktur.

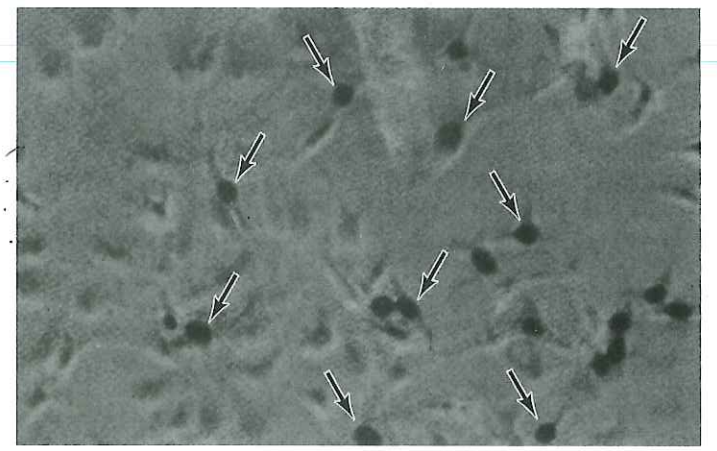


Şekil 14.2 Embriyonik hücre döngüsü
Erken embriyonik hücre döngüleri, yumurta sitoplazmasını, hızlı bir şekilde daha küçük hücrelere böler. Hücreler, G_1 ve G_2 içermeyen ve M evresiyle dönüşen kısa S evrelerinden ibaret bu döngüler sırasında büyümezler.

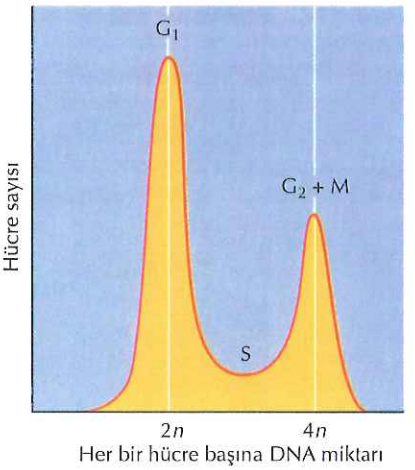
Embriyonik hücrelerin hızla çoğalmasına karşın, erişkin hayvanlarda bazı hücrelerin (örn., sinir hücreleri) bölünmesi tümüyle durmuştur ve diğer bir çok hücre de, sadece, yaralanma ya da hücre ölümü sonucu kaybedilen hücrelerin yenilenmesi gerektikçe, nadiren bölünürler. Bunlara örnek olarak, deri fibroblastları ve karaciğer gibi bazı iç organ hücreleri verilebilir. Gelecek bölümde daha geniş tartışılacağı gibi, bu hücreler G_1'den çıkarak hücre döngüsünde **G_0** olarak adlandırılan, sessiz (quiescent) evreye girerler. G_0 evresinde, hücreler metabolik olarak aktiftirler, uygun hücre-dışı sinyaller tarafından uyarılmadıkları sürece çoğalmazlar.

Hücre döngüsü analizi, yukarıda tartıştığımız farklı evrelerdeki hücrelerin belirlenmesini gerektirir. Mitotik hücreler mikroskobik olarak ayırt edilebilseler de, döngünün diğer evrelerindeki (G_1, S ve G_2) hücreler biyokimyasal kriterlerle saptanmalıdırlar. S evresindeki hücreler, sadece DNA sentezinde kullanılan radyoaktif timidini bağladıkları için kolaylıkla belirlenebilirler (Şekil 14.3). Örneğin; kültürde hızla çoğalan insan hücreleri kısa bir süre için (örn., 15 dakika) radyoaktif timidine maruz bırakılır ve otoradyografi ile incelenirse, hücrelerin, S evresindeki hücre kesimini oluşturan, yaklaşık üçte birinin radyoaktif olarak işaretlendiği gözlenir.

Bunun gibi hücre işaretleme deneyleri, hücre döngüsünün çeşitli evrelerinin uzunluğunun belirlenmesinde de kullanılabilir. Örneğin; 15 dakika radyoaktif timidine maruz bırakılan ve radyoaktif timidin uzaklaştırıldıktan sonra, farklı zaman aralıklarında otoradyografi ile izlenen hücre kültürleri hazırlanır. Radyoaktif timidin uygulandığında S evresinde olup radyoaktif işaretlenen interfaz hücreleri, S evresinin kalan kısmı ve G_2 süresince, birkaç saat gözlenir. Bunun aksine, radyoaktif işaretli mitotik hücreler, işaretlemeden 4 saat sonrasına kadar gözlenemezler. Bu dört saatlik zaman aralığı, S evresinin



Şekil 14.3 Radyoaktif timidin katılımı yoluyla S evresindeki hücrelerin belirlenmesi
Hücreler radyoaktif timidin ile muamele edildi ve otoradyografiyle incelendi. İşaretlenen hücreler oklarla belirtilmiştir. (D.W. Stacey et al., 1991. *Mol. Cell Biol.* 11: 4053.)



Şekil 14.4 Hücre DNA içeriğinin saptanması
Bir hücre populasyonu, DNA'ya bağlanan bir floresan boya ile işaretlenir. Daha sonra, hücreler, her bir hücrenin floresans yoğunluğunu saptayan bir akış sitometresinden geçirilir. Elde edilen değerler, hücre sayısına karşı, hücrenin DNA içeriğiyle orantılı floresans yoğunluğu olarak işaretlenir. Dağılım, $2n$ ve $4n$ DNA'lı, sırasıyla döngünün G_1 ve G_2/M evrelerinde bulunan, hücre sayısına karşılık gelen iki tepe oluşturur. S evresindeki hücreler $2n$ ile $4n$ arasında DNA içerikleri nedeniyle, bu iki tepe arasında dağılım gösterir.

sonunda radyoaktif timidine maruz kalan bir hücrenin mitoza girmesi için gerekli olan minimum zamana, yani G_2'nin uzunluğuna denk gelir.

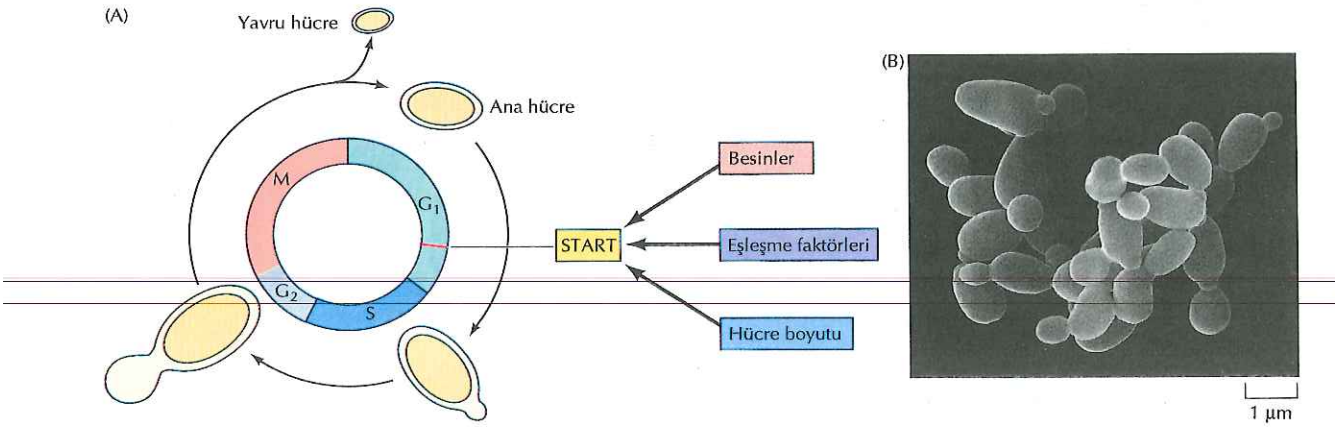
Hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücreler DNA içeriklerine göre de ayırt edilebilirler (Şekil 14.4). Örneğin; G_1'deki hayvan hücreleri diploiddir (her kromozomun iki kopyasını içerirler), DNA içerikleri 2n dir (n, genomun haploid DNA içeriğini temsil eder). S evresinde replikasyon, hücrenin DNA içeriğini 2n'den 4n'ye çıkarır, yani S'deki hücreler 2n ile 4n arasında DNA içeriğine sahiptir. G_2 ve M'deki hücrelerde DNA içeriği 4n olarak kalır, sitokinezden sonra ise 2n'e iner. Hücrenin DNA içeriği, hücrelerin DNA'ya bağlanan floresan boya ile inkübasyonu sonrası **akış sitometresi** veya **floresans ile aktive olan hücre ayırıcı** (FACS) kullanılarak, floresans yoğunluğunun ölçülmesi ile belirlenir. Bu analiz sonucunda, hücrelerin G_1, S ve G_2/M evrelerinden hangisinde olduğu tespit edilir.

Hücre Döngüsünün Hücre Büyümesi ve Hücre-dışı Sinyaller Tarafından Düzenlenmesi

Hücrelerin bölünme döngüsünde ilerlemesi, farklı evrelerde yer alan çeşitli süreçleri denetleyen içsel sinyaller kadar, çevreden gelen hücre-dışı sinyaller ile de düzenlenir. Hücre döngüsünün hücre-dışı sinyaller ile düzenlenmesine örnek olarak, hayvan hücresi çoğalmasında büyüme faktörlerinin etkisi verilebilir. Buna ek olarak, hücre büyümesi, DNA replikasyonu ve mitoz gibi farklı hücresel süreçlerin hepsi, hücre döngüsü sürecinde denetlenmelidir. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde düzenlenme, bir seri kontrol noktası ile sağlanır.

Birçok hücre tipinde, en önemli düzenleyici noktalardan birisi G_1'in sonlarında bulunur ve G_1'den S'ye geçişi denetler. Bu düzenleyici nokta ilk kez, tomurcuklanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ile yapılan çalışmalarda saptanmış ve **START** olarak adlandırılmıştır (Şekil 14.5). Hücreler START'ı bir kez geçince, S evresine girmeleri ve hücre döngüsünü tamamlamaları kaçınılmazdır. Ancak, START noktasından geçiş, maya hücre döngüsünde ileri düzeyde denetlenen ve hücre büyüklüğü kadar besin varlığı gibi dış sinyaller ile de kontrol edilen bir olaydır. Mayalar, besin yetersizliği durumunda döngüyü START noktasında durdururlar ve dinlenme evresine girerler. Yani, START noktası hücre için, bölünmeyi tamamlamak için yeterli besinin bulunup bulunmadığına karar verme noktasıdır. Maya eşleşmesini uyaran polipeptid faktörler de START noktasında hücre döngüsünü durdururlar ve haploid maya hücrelerinin, S evresinde ilerlemek yerine birleşmelerine olanak sağlarlar.

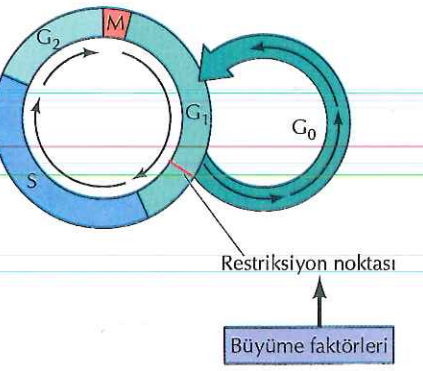
START, hücre-dışı sinyallerle denetlenen bir karar noktası olmanın yanı sıra, hücre büyümesinin, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi ile koordine edildiği noktadır. Bu denetimin önemi özellikle, hücre bölünmesinin farklı büyüklüklerde yavru oluşturduğu tomurcuklanan mayalarda çok belirgindir: büyük bir ana ve küçük bir yavru hücre. Maya hücrelerinin sabit büyüklüğü koruyabilmesi için, tekrar bölünmeden önce yavru hücrenin, büyük ana hücreden daha fazla büyümesi gereklidir. Bu yüzden, hücre büyümesini diğer hücre döngüsü olayları ile ayarlamak için, hücre büyüklüğünün gözlenmesi gereklidir. Bu kontrol, START noktasını geçebilmek için her hücrenin minimum büyüklüğe ulaşmasını gerektiren bir kontrol mekanizması ile sağlanır. Sonuç olarak, küçük yavru hücre G_1'de ana hücreye göre daha uzun zaman kalır ve daha fazla büyür.



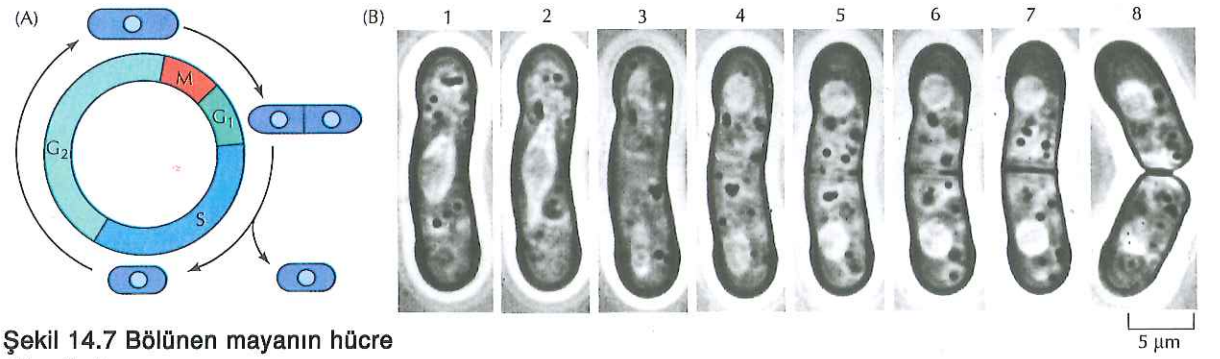
Şekil 14.5 Tomurcuklanan maya hücre döngüsünün denetimi
(A) *Saccharomyces cerevisiae*'nın hücre döngüsü ilk önce, START olarak adlandırılan, ileri G_1'deki bir noktada denetlenir. START'tan geçiş; besinlerin varlığı, eşleşme faktörleri ve hücre boyutu tarafından kontrol edilir. Bu mayaların tomurcuklanarak bölündüklerine dikkat edin. Tomurcuklar, START'ın hemen arkasından oluşmaya başlar ve mitoz sonrasında ana hücreden ayrılana kadar büyümeye devam ederler. Tomurcuklanmayla oluşan yavru hücre, ana hücreye kıyasla küçüktür ve bu nedenle, bir sonraki hücre döngüsünün G_1 evresinde büyümek için daha fazla zamana gereksinir. Tomurcuklanan mayanın hücre döngüsünde, G_1 ve S evreleri normal olmasına karşın, mitotik iğ S evresinde oluşmaya başlar ve belirgin bir G_2 evresi bulunmaz. (B) *S. cerevisiae*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü. Tomurcuğun boyutu, hücrenin döngüdeki yerini gösterir. (B, David M. Phillips / Visuals Unlimited)

Hayvan hücrelerinin çoğalması da, benzer şekilde, hücre döngüsünün G_1 evresinde denetlenir. Özellikle, hayvan hücrelerinde G_1'in sonlarında, **restriksiyon noktası** olarak adlandırılan ve mayalardaki START'a benzer işlev gören bir karar noktası bulunur (Şekil 14.6). Ancak, mayaların aksine, hayvan hücrelerinin döngüsü, besin olanaklarıyla değil, hücre çoğalmasını uyaran hücre-dışı büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Uygun büyüme faktörlerinin varlığında, hücre restriksiyon noktasından geçerek S evresine girer. Hücre restriksiyon noktasından bir kere geçtikten sonra, büyüme faktörü uyarısı olmasa dahi, S evresine ve hücre döngüsünün kalan kısmına ilerlemek zorundadır. Diğer taraftan, eğer G_1'de uygun büyüme faktörleri yoksa, hücre döngüsü restriksiyon noktasında durur. Bu şekilde duraklatılmış hücreler, hücre döngüsünde G_0 olarak adlandırılan durağan evreye girerler ve çok uzun süreler çoğalmadan kalabilirler. G_0 hücrelerinin büyümesi durmuş ve protein sentez hızı azalmış olsa da, metabolik olarak aktiftirler. Daha önce belirtildiği gibi, çoğu hayvan hücresi uygun hücre-dışı sinyallerle uyarılmadıkları sürece G_0'da kalırlar. Örneğin; deri fibroblastları, yaralanma sonucu onarım gerektiğinde bölünme için uyarılıncaya kadar G_0 evresinde tutulurlar. Bu hücrelerin çoğalması, trombositlerden salınan ve yaralanmış dokuya komşu fibroblastların çoğalmasını uyaran, plateletkökenli büyüme faktörü tarafından tetiklenir.

Hücrelerin çoğunda çoğalma, öncelikli olarak, G_1'de denetlenmesine karşın, bazı hücre döngüleri G_2'de kontrol edilir. Buna bir örnek, bölünen maya *Schizosaccharomyces pombe*'nin hücre döngüsüdür (Şekil 14.7). *Saccharomyces cerevisiae*'nın aksine, *S. pombe*'nin hücre döngüsü, öncelikli olarak hücre büyüklüğü ve besin düzeyinin gözetildiği temel nokta olan, G_2'den M'ye geçişte



Şekil 14.6 Hayvan hücre döngüsünün büyüme faktörleriyle düzenlenmesi
Büyüme faktörlerinin varlığı, hayvan hücre döngüsünü, geç G_1'de, restriksiyon noktası denilen noktada kontrol eder. G_1 evresinde büyüme faktörleri yoksa, hücreler döngüde, G_0 denilen devinimsiz (quiescent) evreye girerler.



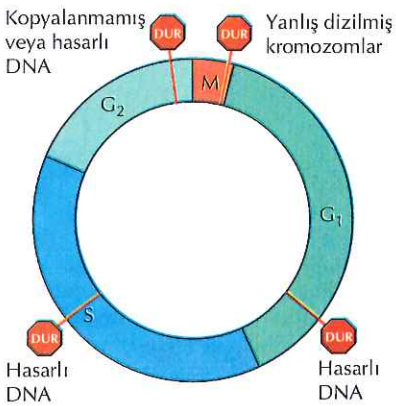
Şekil 14.7 Bölünen mayanın hücre döngüsü
(A) Bölünen mayalar, her iki ucundan uzayarak büyür ve hücrenin ortasında bir duvar oluşturarak bölünürler. Tomurcuklanan mayaların döngüsünün aksine, bölünen mayaların hücre döngüsü normal G_1, S, G_2 ve M evreleri içerir. Sitokinezin G_1'de gerçekleştiğine dikkat ediniz. Hücrenin uzunluğu, döngünün hangi evresinde olduğunu gösterir. (B) *Schizosaccharomyces pombe*'nin, birbirini izleyen mitoz ve sitokinez aşamalarının mikroskop görüntüleri. (B, C.F. Robinow'un izniyle, University of Western Ontario.)

denetlenir. Hayvanlarda hücre döngüsünün G_2'de kontrolüne temel örnek oositlerdir. Omurgalı oositleri, hormonal uyarıyla M evresine geçiş tetikleninceye kadar, uzun süre (insanlarda birkaç on yıl) G_2'de kalırlar. Yani hücre-dışı sinyaller, hücre döngüsünün G_1'den S evresine geçişinin yanısıra G_2'den M'ye geçişi düzenleyerek de hücre çoğalmasını denetlerler.

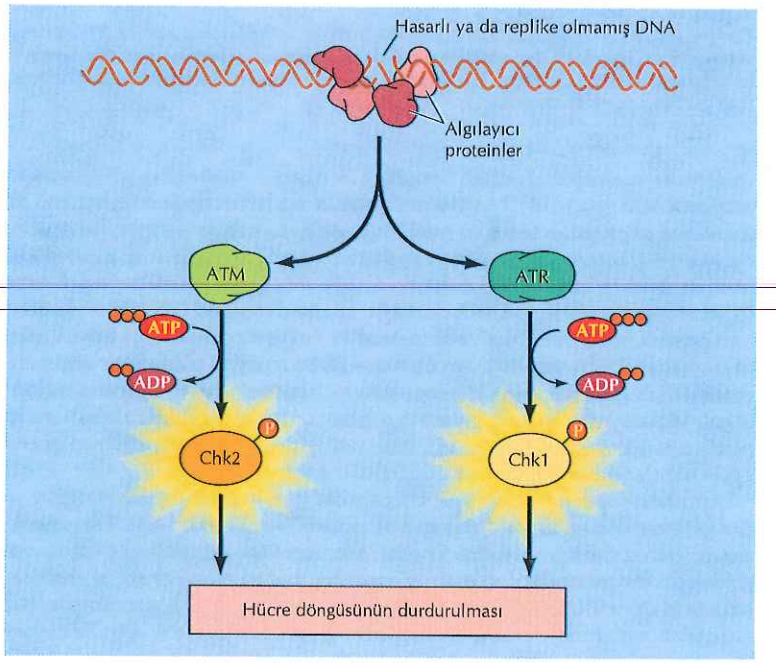
Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Önceki kısımda tartışılan kontroller, döngüyü besin ve büyüme faktörleri gibi hücre dışı sinyaller ile hücre büyüklüğüne göre düzenler. Ayrıca, hücre döngüsünün farklı evrelerindeki olayların, uygun düzenle gerçekleşebilmesi için, koordineli olmaları gereklidir. Örneğin, replikasyon tamamlanmadan hücrenin mitoza girmemesinin kritik önemi vardır. Hücrelerin çoğunda, hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki düzen, bir seri **hücre döngüsü kontrol noktası**na bağlıdır. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engellerler.

Hücre döngüsünde bir kaç kontrol noktası, kromozomların eksik kopyalanmaması ve yavru hücrelere bu şekilde geçmemesi için işlev görür (Şekil 14.8). Bu kontrol noktaları, replike olmamış ya da hasarlı DNA'lara duyarlıdır ve DNA replikasyonunun tamamlanması ya da onarımı ile, hücre döngüsünü ayarlarlar. Örneğin, G_2'deki kontrol noktası DNA replikasyonu tamamlanmadan mitozun başlamasına engel olur. G_2'deki kontrol noktası, replike olmamış DNA'yı algılar ve döngüyü duraklatacak bir sinyal oluşturur. Böylece, G_2 kontrol noktası ile S tamamlanmadan M evresine giriş engellenir ve hücreler, genom tamamen replike oluncaya kadar G_2'de kalırlar. Ancak bundan sonra G_2'deki inhibisyon ortadan kalkar ve hücre mitoza geçerek, tümüyle replike olmuş kromozomları yavru hücrelere dağıtır. Replike olmamış DNA'ları algılamasının yanı sıra, G_2'deki kontrol noktaları, hasarlı DNA'lara da duyarlıdır. Eğer DNA hasarı saptanırsa, kontrol noktasındaki duraklama, hasarın onarılması için gerekli zamanı sağlar.



Şekil 14.8 Hücre döngüsü kontrol noktaları
Birkaç kontrol noktası, yavru hücrelere genomun tamamının geçmesini garanti eder. Önemli bir kontrol noktası, hasarlı ya da kopyalanmamış DNA'ya yanıt olarak, hücreleri G_2'de durdurur. Hasarlı DNA varlığı, aynı zamanda G_1 ve S'deki kontrol noktalarında da hücre döngüsünü durdurur. M evresindeki diğer bir kontrol noktası, yavru kromozomların mitoz iğinde düzgün dizilmemeleri halinde, mitozu durdurur.

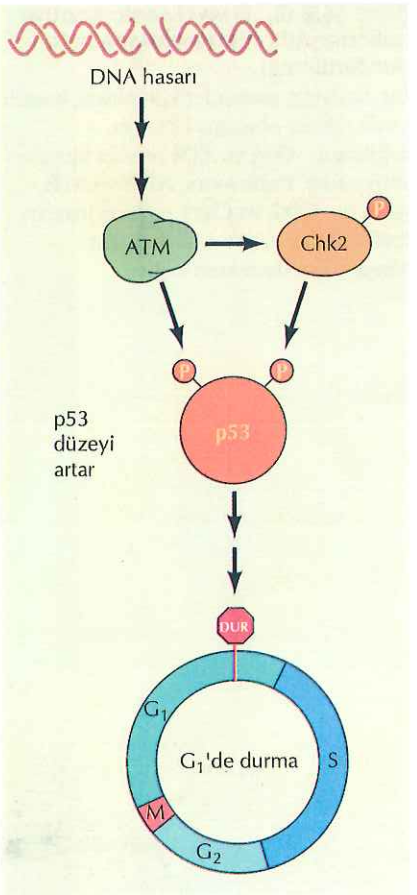


Şekil 14.9 G_1, S ve G_2'deki kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulması
Bir algılayıcı proteinler kompleksi, hasarlı ya da replike olmamış DNA'ya bağlanarak ATM ve ATR protein kinazları aktive eder. Daha sonra, ATM ve ATR, sırasıyla, Chk2 ve Chk1 proteinkinazları fosfatlayarak aktive eder ve hücre döngüsünün durmasını sağlar.

DNA hasarı, hücre döngüsünü sadece G_2'de değil, G_1 ve S evresi kontrol noktalarında da duraklatır. G_1 kontrol noktasında duraklama, hasarlı DNA'nın, S evresine girmeden onarılabilmesine olanak sağlar. S'deki kontrol noktası, hasarlı DNA'nın replike olmadan onarılması için, DNA'nın bütünlüğünü sürekli izler. Ayrıca, S evresi kontrol noktası, DNA replikasyonu sırasında yanlış baz eşleşmesi ya da DNA bölümlerinin eksik replikasyonu gibi, oluşabilecek hataları bulma ve onarma şeklinde, kalite kontrol görevi yapar.

G_1, S ve G_2 kontrol noktalarında hücre döngüsünün durması, hasar görmüş ya da replike olmamış DNA'ya bağlanan protein kompleksler ile tetiklenir (Şekil 14.9). Henüz tam olarak tanımlanmamış olan bu proteinler, DNA hasarını algılarlar ve sadece hücre döngüsünü duraklatan sinyal yollarını uyarmakla kalmaz, DNA onarımını ve programlı durumlarda hücre ölümünü aktive ederler. Algılayıcı proteinlerin doğrudan hedefleri ATM ve ATR olarak simgelenen, birbiriyle ilintili iki protein kinazdır ve bunlar DNA hasarına cevaben aktifleşirler. Bu proteinler ilk olarak, ataxia telangiectasia hastalığından sorumlu olan ATM kodlayan gendeki mutasyonlarla tanımlanmıştır. Bu hastalık, sinir ve immün sistem hataları oluşturduğu gibi, etkilenmiş bireylerde kanser sıklığı da yüksektir. ATR daha sonra ATM'nin yakın akrabası olarak tanımlanmıştır. Bir kez aktifleşen, ATM ve ATR sırasıyla Chk2 ve Chk1 kinazları fosfatlayarak aktive ederler. Bu kez de Chk1 ve Chk2, hücre döngüsünü düzenleyen sistemin bileşenlerini fosfatlayarak, hücre döngüsünü duraksatırlar.

Memeli hücrelerinde G_1 kontrol noktasındaki duraksama, Chk2 ve ATM tarafından fosforillenen, **p53** olarak bilinen diğer bir proteinin etkisi ile gelişir (Şekil 14.10). Fosforillenme, aksi halde süratle yıkılacak olan p53'ü, kararlı hale getirir ve DNA hasarı p53 miktarında hızlı artışa neden olur. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve ekspresyon artışı, hücre döngüsünü duraksatacak hedef genlerin



Şekil 14.10 G_1 duraklamasında p53'ün rolü

p53 proteini, hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında durdurulmasında önemli rol oynar. DNA hasarına yanıt olarak, ATM ve Chk2 tarafından fosfatlanan p53 stabilize olur ve hücredeki p53 düzeyi hızla yükselir. Daha sonra p53, hücre döngüsünü durduracak olan proteinlerin ekspresyonunu indükler.

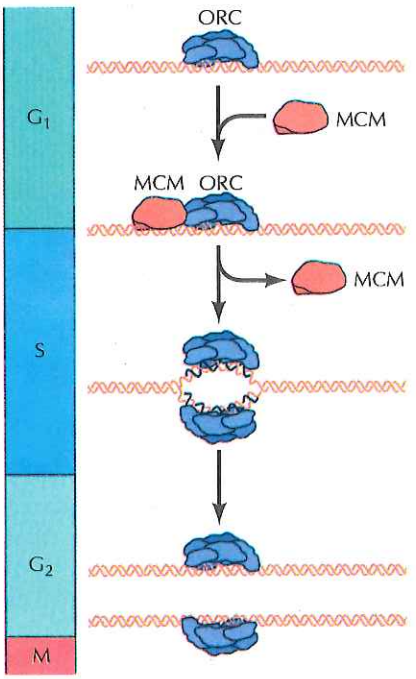
uyarılmasına yol açar. İnsan kanserlerinde p53'ü kodlayan gen sıklıkla mutasyona uğramış durumdadır. Bu mutasyonlarla p53 işlev kaybı, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G_1'de duraksamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak onarılmadan yavru hücrelere geçer. Hasarlı DNA'ların kalıtımı, mutasyon sıklığında artışa ve genel bir genom kararsızlığına neden olur, bu da kanser gelişimine katkıda bulunur. *p53* genindeki mutasyonlar insan kanserlerinde en yaygın genetik değişikliktir (bkz. Bölüm 15). Bu durum, hücre döngüsü düzenlenmesinin çok hücreli organizmaların hayatında ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunun göstergesidir.

Genomun bütünlüğünü koruyan, diğer bir önemli hücre döngüsü kontrol noktası da, mitozun sonlarında yer alır (bkz. Şekil 14.8). İğ kontrol noktası olarak bilinen bu kontrol noktası, kromozom setinin yavru hücrelere tam ve doğru dağıtılması için kromozomların, mitotik iğ üzerindeki dizilimini gözlemler. Örneğin, iğ üzerinde bir ya da daha fazla kromozomun uygun yerleşmemesi, kromozomların yavru nükleuslara dağılımından önce, metafazda duraklatılmasına neden olur. İğ kontrol noktası, kromozomların her bir yavru hücreye dağılmak üzere tümüyle organize olmadan, ayrılmamalarını sağlar.

DNA Replikasyonunun, Hücre Döngüsü Başına Bir Kereyle Sınırlanması

G_2 kontrol noktası, S'nin tamamlanmadan mitozun başlamasını engeller, böylece, tamamen replike olmamış DNA'ların yavru hücrelere dağılamamasını sağlar. Hücre döngüsü başına genomun bir kez replike olmasının sağlanması da en az bu kadar önemlidir. Yani, DNA, S evresinde replike olduğunda, hücre mitozu tamamlayıp hücre döngüsü bitinceye kadar, kontrol mekanizmaları DNA replikasyonunun yeniden tetiklenmesine engel olmalıdır. Bölüm 5'de anlatıldığı gibi, memeli hücrelerinin DNA'larını kopyalamak için kullandıkları binlerce orijinin (başlangıç noktası) her birinde replikasyonun çok dikkatle denetlenmesi ve hücre döngüsünün S evresinde genom segmentlerinin sadece tek bir defa kopyalanmasının sağlanması gerekir.

Her bir hücre döngüsü için DNA replikasyonunu bir defayla sınırlayan moleküler mekanizma, MCM proteinleri olarak adlandırılan ve başlangıç noktasına, replikasyon kompleksi (ORC) (bkz. Şekil 5.16) ile birlikte bağlanan, bir protein ailesinin etkinliğini gerektirir. MCM proteinleri, kopyalamanın başlamasına izin veren 'yetki faktörleri' olarak davranırlar (Şekil 14.11). DNA'ya bağlanmaları, hücre döngüsü sırasında, G_1'de bağlanabilecek şekilde düzenlenmiştir



Şekil 14.11 DNA replikasyonunun sınırlanması

ORC (orijin replikasyon kompleksi) ile birlikte replikasyon orijinine bağlanan ve DNA replikasyonunun başlaması için gerekli olan MCM proteinleri, DNA replikasyonunun her hücre döngüsünde bir kez gerçekleşmesini sağlar. MCM proteinleri DNA'ya sadece G1'de bağlanabilir ve S evresinde DNA replikasyonu başladıktan sonra MCM proteinleri ayrılır ve böylece, mitoz sonlanıncaya kadar replikasyon başlayamaz.

ve DNA replikasyonunun, sadece hücre S evresine girdiğinde başlamasına izin verir. Başlama gerçekleşince, MCM proteinleri orijinden ayrılır, böylece hücre mitozdan geçip bir sonraki hücre döngüsünün G_1 evresine girene kadar kopyalanma tekrar başlatılmaz. Hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyen protein kinazlar (bu bölümde ileride tartışılacak), henüz tamamen anlaşılamamış bir mekanizmayla, hücre döngüsünün S, G_2 ve M evrelerinde MCM proteinlerinin DNA'ya bağlanmasına engel olurlar.

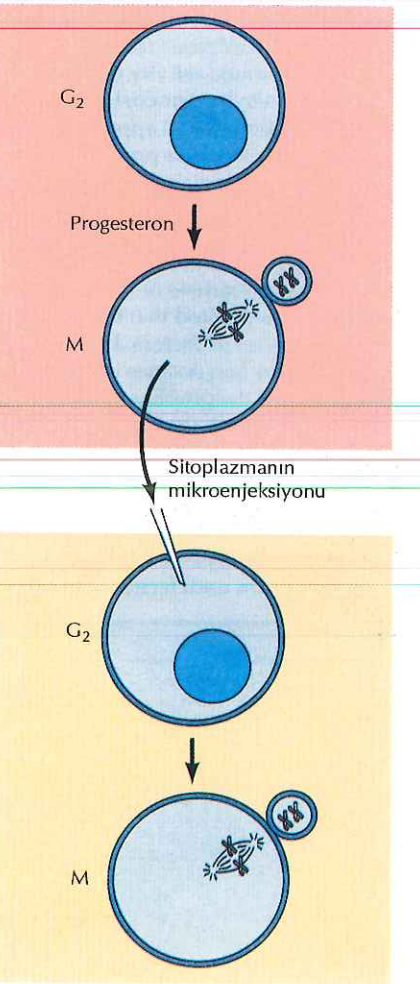
Hücre Döngüsü Gelişiminin Düzenleyicileri

Günümüz hücre biyolojisinde en heyecan verici gelişmelerden biri, ökaryot hücrelerin bölünme döngüsünde ilerlemesini kontrol eden moleküler mekanizmaların anlaşılmaya başlanmasıdır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili şu anki bilgilerimiz; maya, deniz kestanesi, kurbağa ve memeliler gibi, geniş yelpazedeki organizmalar üzerinde yapılan deneylerden elde edilen verilerin ilişkilendirilmesiyle oluşturulmuştur. Bütün bu çalışmalar, tüm ökaryotların hücre döngülerinin, korunmuş bir seri protein kinaz tarafından kontrol edildiğini göstermektedir ve bu protein kinazlar temel hücre döngüsü geçişlerinden sorumludur.

MPF: Cdc2 ve Siklin Dimeri

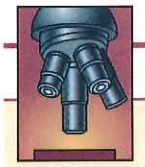
Hücre döngüsü düzenlenmesinden sorumlu anahtar moleküllerin belirlenmesinde üç farklı deneysel yaklaşımdan yararlanılmıştır. Bu yaklaşımlardan ilki, kurbağa oositleri ile yapılan çalışmalarla başlamıştır (Şekil 14.12). Bu oositler, mayozun M evresine girişleri hormonla tetikleyinceye kadar, hücre döngüsünün G_2 evresinde duraklatılırlar (ileride tartışılacak). Birbirinden bağımsız iki araştırıcı grubu (Yoshio Masui ve Clement Markert; Dennis Smith ve Robert Ecker), 1971'de hormonla uyarılmış oositlerden alınan sitoplazmanın mikroenjeksiyonla, G_2'de duran oositlere verilmesinin, bu yumurtaların M evresine girişini uyardığını buldular. Yani, hormon uygulanmış oositlerde var olan bir sitoplazmik faktör, hormon uygulanmış oositlerde G_2'den M'ye geçişi uyarıyordu. Oositlerin mayoza geçişi genellikle yumurta olgunlaşması olarak kabul edildiğinden, bu sitoplazmik faktör **olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF)** olarak adlandırıldı. Ancak, daha sonraki çalışmalar, MPF aktivitesinin oositlerin mayoza girişiyle sınırlı olmadığını gösterdi. Aksine, MPF somatik hücrelerde de bulunur ve hücrelerin, mitotik döngünün M evresine girişini uyarır. Oositlere özgün olmak yerine, MPF'nin, G_2'den M'ye geçişte genel düzenleyici olarak davrandığı görülmektedir.

Hücre döngüsü düzenlenmesinin anlaşılması için ikinci yaklaşım, 1970'lerin başlarında Lee Hartwell ve çalışma arkadaşlarının öncülüğünü yaptığı, mayaların genetik analiziydi. Tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisia* ile çalışan bu araştırıcılar, hücre döngüsü bozuk olan, sıcaklığa-duyarlı mutantları tanımladılar. Bu



Şekil 14.12 MPF'nin tanımlanması

Kurbağa oositleri hücre döngüsünün G_2 evresinde durduruldu ve mayozun M evresine giriş, progesteron hormonuyla uyarıldı. Burada şematize edilmiş olan deneyde, G_2'de durdurulmuş olan oositlere, G_2'den M'ye geçmiş olan hücrelerin sitoplazması mikroenjeksiyonla aktarıldı. Sitoplazmanın bu şekilde aktarılması, hormon uyarımı olmadan G_2, M geçişini indükledi ve böylece, mayozun M evresine girişi uyarmak için sitoplazmadaki bir faktörün (MPF) yeterli olduğu gösterildi.



ANAHTAR DENEY

MPF'nin Keşfi

Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes

Yoshio Masui ve Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT

Journal of Experimental Zoology, 1971, Volume 177, Pages 129-146

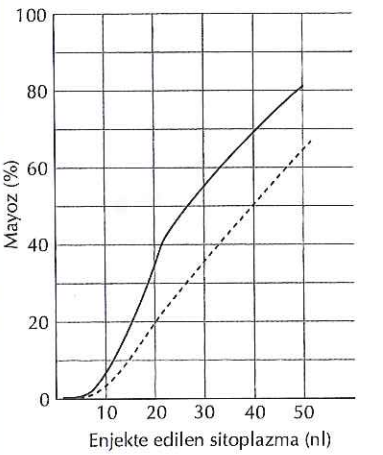
Bağlam

1960'larda yapılan çekirdek nakli ve hücre füzyon deneyleri, mitotik hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücrelerin içine aktarılan nükleusların, genellikle, konakçı hücrenin davranışını benimsediğini göstermiştir. Böylece, nükleer mitotik aktivitenin sitoplazma tarafından düzenlendiği anlaşıldı. Ancak, nükleusların mitotik aktivitesini kontrol ettiği varsayılan sitoplazmik faktörlerin varlığının gösterilmesi için, doğrudan deneysel yaklaşıma gerek vardı. Kurbağa oositlerinin mayozu sırasında, nükleer davranışı düzenleyen sitoplazmik faktörlerin rolünü araştıran Masui ve Markert'in çalışmaları ile bu gösterilmiş oldu.

Kurbağa oosit mayozunun bazı özellikleri, sitoplazmik faktörler tarafından kontrol edildiğini düşündürmüştür. Özellikle, kurbağa oositlerinin mayozu, mayoz I'in profazının sonunda durdurulur. Progesteron hormonu uygulanması, somatik hücrelerin G_2'den M'ye geçişine benzer şekilde, mayozu, kaldığı yerden, yeniden başlatır. Oositler, daha sonra, mayoz II'nin metafaz evresinde, döllenme oluncaya kadar ikinci bir duraklamaya girerler. Masui ve Markert, hormon uygulamasının ve döllenmenin her ikisinin de mayoz üzerinde etkilerinin, ikincil olarak nükleus davranışını denetleyen sitoplazma değişikliklerine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu hipotezlerini, hormonla uyarılmış oositten aldıkları sitoplazmayı, uyarılmamış oosite transfer ederek test ettiler. Bu deneyler, Masui ve Markert'in, olgunlaşmayı sağlayan faktör (MPF) olarak adlandırdıkları bir sitoplazmik faktörün, hormon uygulaması sonunda mayozun başlatılmasından sorumlu olduğunu göstermiştir.

Deneyler

Kurbağa oositleri, büyüklükleri ve cam mikropipet enjeksiyonu sonrasında yaşayabilme özelliklerinden dolayı, sitoplazmik faktörlerin aktivitelerinin test edilmesinde, çok uygun bir deneysel sistem olmuşlardır. Masui ve Markert'in deneylerinin temel tasarımı, progesteron verilerek mayozun tekrar başlatıldığı, verici oositlerden sitoplazmanın çıkartılması idi. Daha sonra bu sitoplazma farklı miktarlarda, uyarılmamış alıcı yumurtalara enjekte edildi. Sonuç olarak, verici oositlere hormon uygulamasından altı ya da daha fazla saat sonra alınan sitoplazmalar, enjekte edildikleri alıcılarda mayozun yeniden başlamasını sağladılar (şekle bakınız). Buna karşın, progesterona maruz bırakılmamış kontrol oositlerden alınan sitoplazmanın enjeksiyonu ise alıcılar üzerinde



Alıcı oositlere, progesteron ile muamele edilmiş oositlerden alınan sitoplazmanın belirli miktarları enjekte edildi. Vericinin sitoplazması ya, oositin merkezinden bir mikropipet ile alınır (düz çizgi), ya da tüm oositlerin homojenizasyonu ile hazırlanır (kesik çizgi). Sonuçlar, mayozu sürdürmeye uyarılan, enjekte edilmiş oositlerin yüzdesi olarak verildi.

mutantların (*cdc* olarak adlandırılırlar) ana karakteristikleri, hücre döngüsünün belirli noktalarında büyümelerinin durmasıydı. Örneğin; *cdc28* olarak isimlendirilen önemli bir mutant, START noktasında hücre döngüsünün duraklamasına sebep olur ki, bu da Cdc28 proteininin G_1'deki kritik düzenleyici noktadan geçişte gerekli olduğunu göstermektedir (Şekil 14.13). Benzer hücre döngüsü mutantları, Paul Nurse ve arkadaşları tarafından *Schizosaccharomyces pombe* (bölünen maya)'de izole edildi. Bu mutantlardan *cdc2*, *S. pombe* hücre döngüsünü hem G_1'de hem de, temel düzenleyici nokta olan, G_2'den M'ye geçişte durdurur. Daha sonraki çalışmalar, *S.*

hiçbir etki göstermedi. Böylece, hormon uygulanan oositlerin, progesterona hiç maruz kalmamış alıcılarda mayozu yeniden başlatabilme özelliğine sahip sitoplazmik faktörleri içerdiği göstermiş oldu.

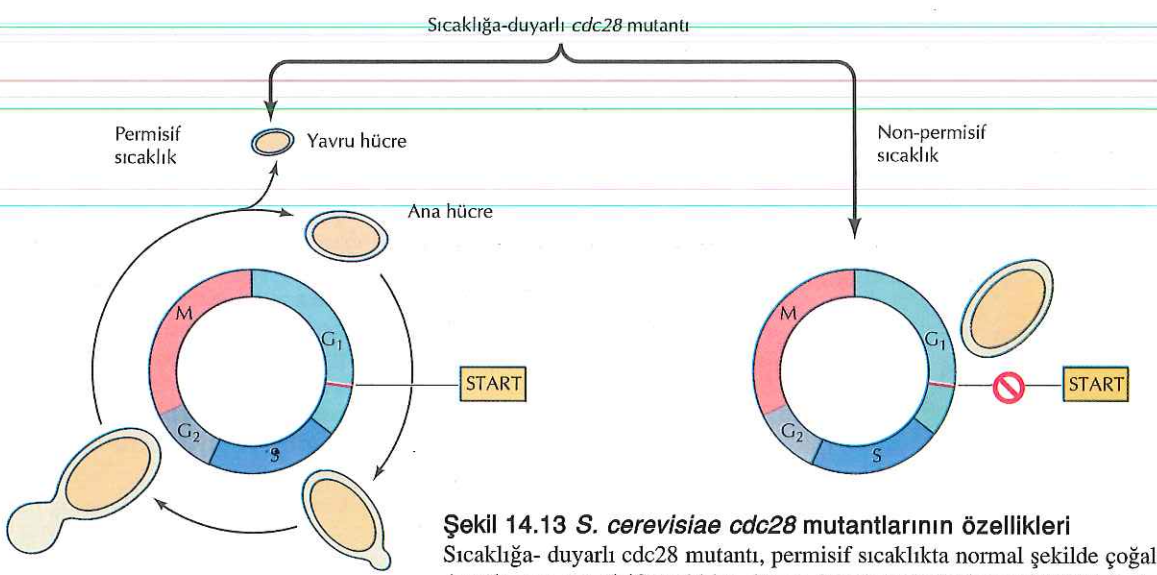
Kontrol deneyleri, verici sitoplazmasında progesteronun kendisinin mayoz başlatıcı faktör olma olasılığını ortadan kaldırmıştır. Özellikle, alıcı yumurtaların içine enjekte edilen progesteronun mayozu başlatamaması bunu göstermiştir. Hormonun sadece dışarıdan uygulanması halinde etkili olması, progesteronun, belirli bir sitoplazmik faktörü aktive etmek için, yüzey reseptörü üzerinden etkilediğini göstermektedir. Ayrı olarak, Dennis Smith ve Robert Ecker (The interaction of steroids with *Rana pipiens* oosytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25 : 232 – 247, 1971) tarafından yapılan benzer deneylerde de aynı sonuca varılmıştır. İlginç olan, progesteronun bu sistemdeki davranışının birçok hücredeki davranışından farklı olmasıdır, çünkü progesteron normalde plazma zarından geçer ve hücre-içi reseptöre bağlanır (bkz Bölüm 13). Ancak, oositlerde progesteron kesinlikle hücre yüzeyinde etkilidir ve oosit sitoplazması içinde belli bir faktörü aktive eder. Oosit mayozunun yeniden başlaması çoğunlukla oosit olgunlaşması olarak adlandırıldığından, Masui ve Markert yeni keşfettikleri mayoz düzenleyicisine "olgunlaşmayı ilerleten faktör" adını uygun gördüler.

Yoshio Masui

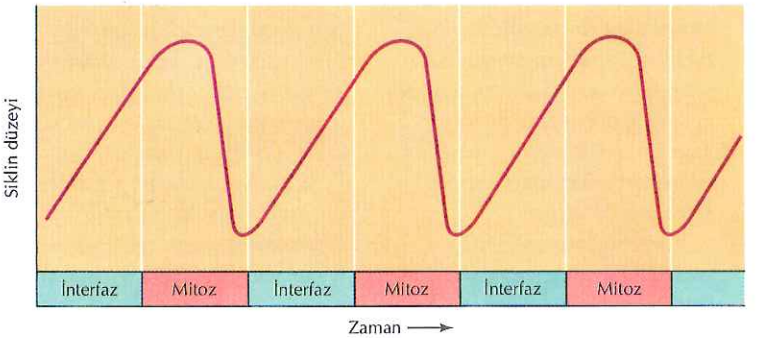
Clement Markert

Etki

Kurbağa oositlerinde keşfedilmesinin ardından, MPF'nin somatik hücrelerde de bulunduğu ve mitozun G_2'den M'ye geçişini başlattığı gösterildi. Sonuçta, MPF'nin hem mitotik hem de mayotik hücre döngülerinin M evresine girişindeki genel düzenleyici olduğu ortaya çıktı. Sonunda, MPF'nin 1988 yılında kurbağa oositlerinden saflaştırılması, maya genetiği ve deniz kestanesi embriyolarıyla bu önemli hücre döngüsü düzenleyicisinin kimliğinin açıklanması amacıyla yapılan çalışmalarla, aynı noktada birleşti. Şöyle ki, MPF'nin siklin B ve Cdc2 protein kinazın bir dimeri olduğu bulundu. Daha sonraki çalışmalar, siklin B ve Cdc2'nin büyük protein ailelerinin üyeleri olduğunu, farklı siklinlerin ve Cdc2 benzeri protein kinazların, diğer hücre döngüsü geçişlerinin düzenlenmesinde MPF'ye analog olarak fonksiyon gösterdiğini saptadı. Kurbağa oositlerinde MPF'nin keşfi, tüm ökaryotlarda korunmuş olan hücre döngüsünü düzenleyici sistemin anlaşılmasına yol açtı.



Şekil 14.13 *S. cerevisiae cdc28* mutantlarının özellikleri
Sıcaklığa- duyarlı cdc28 mutantı, permisif sıcaklıkta normal şekilde çoğalır. Ancak, non-permisif sıcaklıkta, hücre döngüsünde ilerleme START'da durur.

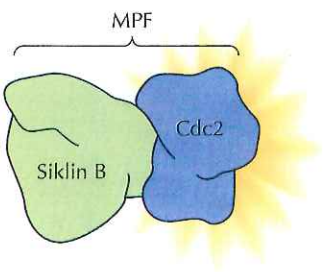


Şekil 14.14 Deniz kestanesi embriyosunda siklin birikimi ve yıkımı
Siklinler, interfaz boyunca birikip, mitozun sonuna doğru hızla yıkılan proteinler olarak tanımlanır.

cerevisiae cdc28 ve *S. pombe cdc2*'nin işlevsel olarak homolog genler olduğunu ve her iki maya türünde de, hem START noktasından geçişte hem de mitoza girişte gerekli olduklarını gösterdi. *S. cerevisia* ve *S. pombe* arasında genetik isimlendirme farkından doğacak karışıklıktan kaçınmak için, bu kitapta her iki genin kodladığı proteinler Cdc2 olarak anılacak. Cdc2 ile daha sonraki çalışmalar iki önemli noktayı açığa çıkarmıştır. İlk olarak; moleküler klonlama ve dizi analizleri sonucu, cdc2'nin bir potein kinaz kodladığı bulundu ki bu, hücre döngüsü kontrolünde protein fosforillenmesinin önemini gösteren ilk kanıttı. İkinci olarak; mayada ve tanımlanan cdc2 ile benzer bir insan geni tanımlandı ve mayada işlevsel olduğu gösterildi. Bu, hücre döngüsü düzenleyicilerinin korunmuş aktivitesinin önemli bir kanıtı olmuştur.

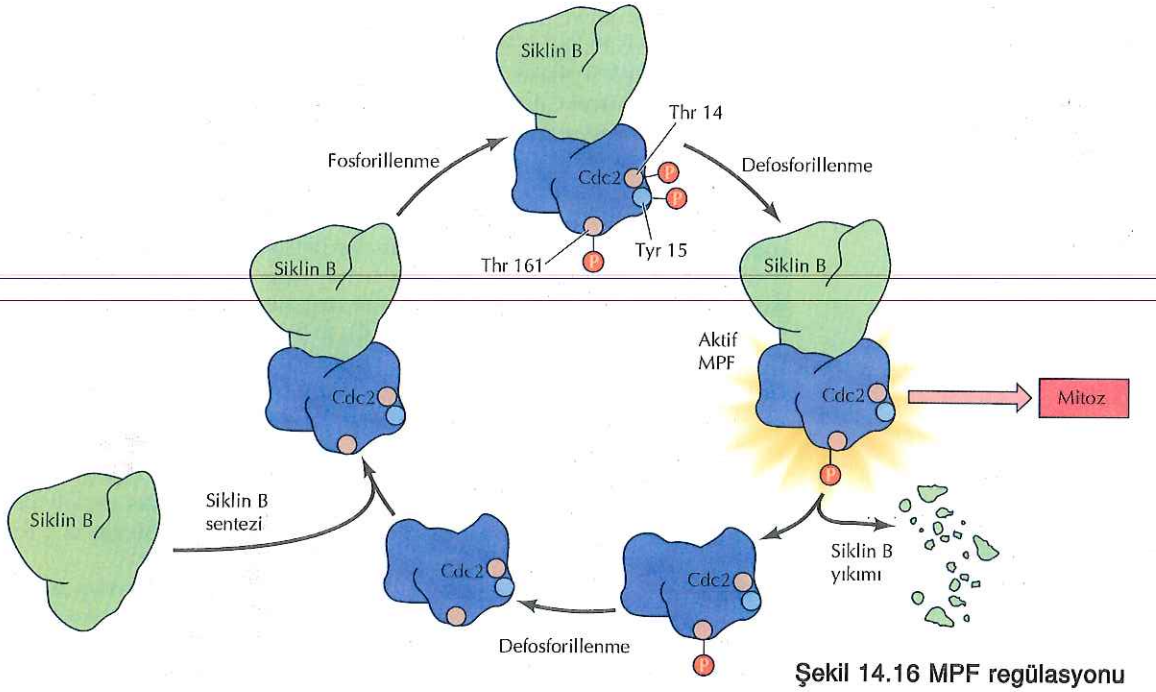
MPF'nin bulunması ve maya genetiği ile aynı noktada birleşen üçüncü araştırma dizisi, denizkestanesi erken embriyolarındaki protein sentezi çalışmalarından doğmuştur. Döllenmeyi takiben bu embriyolar bir seri hızlı hücre bölünmesine uğrarlar. Beklenmedik şekilde, protein sentezi inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, bu embriyonik hücre döngülerinin M evresine girebilmek için yeni protein sentezine ihtiyaç duyduklarını gösterdi. Tim Hunt ve çalışma arkadaşları 1983'de, denizkestanesi ve deniz tarağı embriyolarında periyodik olarak biriken ve parçalanan iki protein tanımladılar. Bu proteinler interfaz boyunca birikip, daha sonra her mitozun sonuna doğru hızla parçalanırlar (Şekil 14.14). Hunt, bu proteinleri **siklinler** (iki protein, siklin A ve siklin B olarak belirtildi) olarak isimlendirdi ve bunların periyodik birikim ve yıkılımlarının, M evresine giriş ve çıkışı kontrol ederek mitozu tetikleme fonksiyonlarının olabileceğini ileri sürdü. Joan Ruderman ve çalışma arkadaşları 1986 yılında, kurbağa oositlerine siklin A mikro enjeksiyonunun G_2'den M'ye geçişi tetiklemek için yeterli olduğunu göstererek siklinlerin bu basamaktaki doğrudan rolünü tanımladılar.

Başlangıçta birbirinden bağımsız olan bu yaklaşımlar, 1988'de James Maller'in laboratuarında kurbağa yumurtalarından MPF'nin saflaştırılmasından sonra, çarpıcı bir şekilde birbiri ile ilişkili hale geldi. Bir kaç laboratuvarda MPF'nin moleküler niteliğinin belirlenmesi, hücre döngüsünün bu korunmuş düzenleyicisinin iki alt birimden meydana geldiğini göstermiştir: Cdc2 ve siklin B (Şekil 14.15). Düzenleyici alt birim siklin B, Cdc2 protein kinazın katalitik aktivitesi için gereklidir. Bu durum, MPF aktivitesinin, hücre döngüsünün ilerlemesi sırasında siklin B'nin periyodik birikimi ve parçalanması ile kontrol edildiği fikrini destekleyici niteliktedir.



Şekil 14.15 MPF'nin yapısı
MPF, siklin B ve Cdc2 protein kinazdan oluşan bir dimerdir.

Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalar, siklin B'nin bu rolünü doğruladıkları gibi, MPF'nin Cdc2'nin fosforillenmesi ve defosforillenme ile denetlendiğini de göstermiştir (Şekil 14.16). Memeli hücrelerinde siklin B sentezi S evresinde başlar. Siklin B daha sonra



Şekil 14.16 MPF regülasyonu
Cdc2, S ve G_2 süresince siklin B ile kompleksler oluşturur. Cdc2 daha sonra, aktivitesi için gerekli olan, treonin-161'de ve Cdc2 aktivitesini bastırmak için de tirozin-15'de (ve omurgalılarda treonin-14) fosforillenir. Thr14 ve Tyr15 in defosforilasyonu, G_2'den M'ye geçişte MPF'yi aktifleştirir. MPF aktivitesi daha sonra, mitozun sonuna doğru, siklin B'nin proteolitik olarak yıkılmasıyla sonlanır.

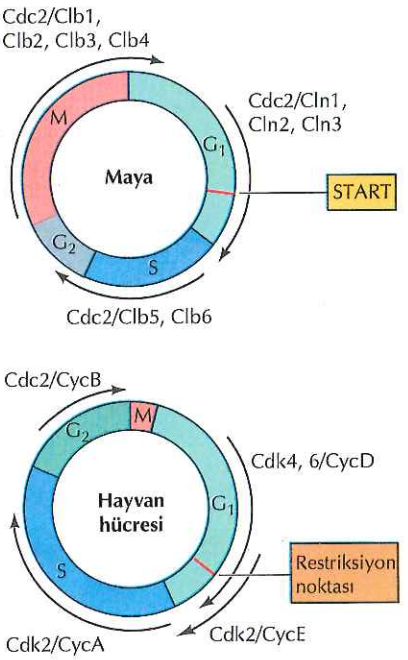
birikerek S ve G_2 süresince Cdc2 ile birlikte kompleks oluşturur. Bu kompleksler oluştuğunda, Cdc2, iki önemli kontrol noktasından fosfatlanır. Bu fosforillenmelerden biri treonin-161 üzerinde olur ve Cdc2 kinaz aktivitesi için gereklidir. İkincisi, omurgalılarda tirozin-15 ve buna komşu treonin-14'ün fosforillenmesidir. Wee1 olarak adlandırılan bir protein kinaz tarafından katalizlenen Tirozin-15 fosforilasyonu, Cdc2 aktivitesini engelleyerek, S ve G_2 süresince inaktif Cdc2/siklin B kompleksinin birikimine neden olur. G_2'den M'ye geçiş ise, Cdc25C olarak isimlendirilen protein fosfatazın treonin-14 ve tirozin-15'i defosforillenmesi sonucunda, Cdc2/siklin B kompleksinin aktifleşmesi ile gerçekleşir.

Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, bir kere aktifleştikten sonra, Cdc2 protein kinaz, M evresinin olaylarını başlatan bir grup, farklı hedef proteini fosfatlar. Ayrıca, Cdc2 aktivitesi, siklin B'nin ubükitin-aracılıklı proteoliz ile parçalanmasını tetikler. Siklin B'nin proteolitik yıkımı Cdc2'yi inaktive ederek, hücrenin mitozdan çıkmasını, sitokineze uğramasını ve tekrar interfaza dönmesini sağlar.

Siklin ve Siklin-Bağımlı Kinaz Aileleri

MPF'nin (Cdc2/siklin B) yapı ve fonksiyonu, sadece M evresine giriş ve çıkışın anlaşılması için moleküler temel sağlamakla kalmamış, aynı zamanda diğer hücre döngüsü geçişlerinin düzenlenmesinin anlaşılmasına temel oluşturmuştur. Cdc2/siklin B kompleksinin tanımlanmasıyla sağlanan ipuçları, hücre döngüsü denetiminin anlaşılması üzerinde güçlü bir etki oluşturmuştur. Örnek olarak, sonraki çalışmalar hem Cdc2'nin hem de siklin B'nin, benzer proteinlerin oluşturduğu büyük ailelerin üyeleri olduklarını göstermiştir. Bu ailelerin farklı üyeleri, hücre döngüsünün farklı evrelerinin gelişimini kontrol etmektedir.

Daha önce tartışıldığı gibi, Cdc2, mayada hem START'dan geçişi hem de mitoza girişi kontrol eder. Ancak, bu işlevlerini farklı siklinlerle bir araya gelerek gerçekleştirir (Şekil 14.17). Örnek olarak, G_2'den M'ye geçiş, mitotik B-tipi siklinlerle (Clb1, Clb2, Clb3 ve



Şekil 14.17 Siklin ve siklin-bağımlı kinaz kompleksleri
Mayada START geçişi G_1 siklinlerle (Cln1, Cln2 ve Cln3) birlikte Cdc2 ile denetlenir. Cdc2'nin farklı B-tipi siklinlerle (Clb'ler) oluşturduğu kompleksler S evresinde ilerlemeyi ve mitoza girişi düzenler. Hayvan hücrelerinde, G_1 restriksiyon noktasında ilerleme, Cdk4 ve Cdk6'nın D-tipi siklinlerle yaptığı kompleksler tarafından denetlenir. Cdk2/siklin E kompleksi G_1'de daha sonra devreye girer ve G_1'den S'ye geçiş için gereklidir. Cdk2/siklin A kompleksleri S'de ilerlemek için gereklidir ve Cdc2/siklin B kompleksleri G_2'den M'ye geçişi sağlar.

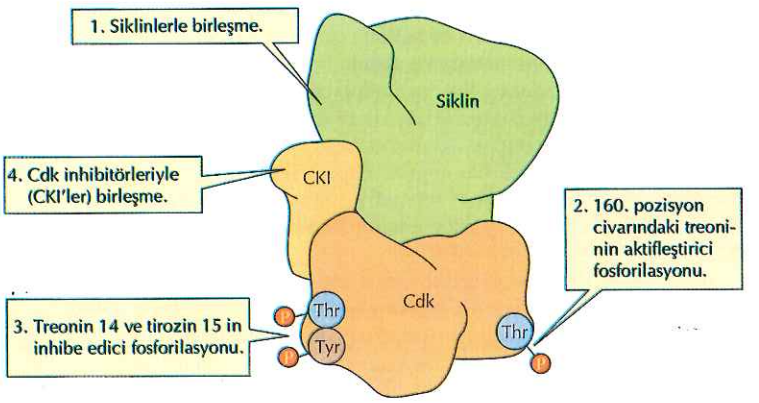
Clb4) bağlanan Cdc2 tarafından gerçekleştirilir. Buna karşın, START'dan geçiş, **G_1 siklinler** ya da **Cln**'ler olarak adlandırılan farklı bir sınıf siklinlerle bağlanan, Cdc2 tarafından kontrol edilir. Cdc2 daha sonra, S evresinde ilerlemek için gerekli olan, farklı B-tipi siklinlerle (Clb5 ve Clb6) bağlanır. B-tipi ve G_1 siklinler ile olan bu bağlanmalar, Cdc2'yi, hücre döngüsünün özgül evrelerinde ilerleme için gerekli olan, farklı substrat proteinleri fosfatlanması için yönlendirir.

Yüksek ökaryotların hücre döngüleri sadece çeşitli siklinler tarafından değil, aynı zamanda çeşitli Cdc2-bağlantılı protein kinazlar tarafından da kontrol edilir. Bu Cdc2-bağlantılı kinazlar **Cdk**'lar (siklin-bağımlı kinazlar) olarak bilinirler. Bu ailenin özgün üyesi olarak, Cdc2 aynı zamanda Cdk1 olarak da bilinir.

Cdk ailesinin bu üyeleri, hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca ilerlemeyi yönlendirmek için spesifik siklinlerle bağlanırlar (bkz. Şekil 14.17). Örneğin, G_1'den S'ye geçiş, temel olarak, siklin D ve E ile bağlanan Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 tarafından düzenlenir. Cdk4 ve Cdk6'nın D-tipi siklinlerle (siklin D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler, G1 de restriksiyon noktasından geçişte kritik bir role sahiptir. Siklin E, G_1'in ilerleyen evresinde eksprese edilir ve Cdk2/siklin E kompleksi G_1'den S'ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. Cdk2'nin siklin A ile yaptığı kompleksler, hücrelerin S evresi sürecinde ilerlemesi için fonksiyon görür. Önceden tartışıldığı gibi, G_2'den M'ye geçiş ise, Cdc2'nin daha sonra siklin B ile oluşturduğu kompleks tarafından sağlanır.

Hücre döngüsü ilerlemesi sırasında, Cdk'ların aktivitesi en az dört moleküler mekanizma ile düzenlenir (Şekil 14.18). Cdc2 için daha önce tartışıldığı gibi, regülasyonun ilk aşaması Cdk'ların, siklin ortaklarıyla bağlanmalarını içerir. Böylelikle, spesifik Cdk/siklin komplekslerinin oluşumu, siklin sentezi ve parçalanması yoluyla kontrol edilir. İkinci olarak, Cdk/siklin komplekslerinin aktivasyonu için, Cdk üzerindeki, 160'ıncı pozisyon yakınında bulunan korunmuş treonin amino asidinin fosforilasyonu gereklidir. Cdk'ların bu aktive edici fosforillenmesi, CAK (*C*dk-aktifleştiren *k*inaz) olarak adlandırılan ve Cdk (Cdk7)'nin siklin H ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelen bir enzim tarafından katalizlenir. Cdk7 ve siklin H'nin kompleksi, RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan (bkz. Bölüm 5) transkripsiyon faktörü TFIIH ile de bağlanır. Cdk ailesinin bu üyesinin, hücre döngüsü regülasyonu yanı sıra, transkripsiyonda da yer aldığı anlaşılmaktadır.

CAK tarafından, aktive edici fosforillenmenin aksine, Cdk regülasyonunun üçüncü mekanizması, Wee1 protein kinaz tarafından katalizlenen, Cdk amino ucuna yakın tirozinlerin, inhibe edici



Şekil 14.18 Cdk düzenlenme mekanizmaları
Cdk'ların aktiviteleri dört moleküler mekanizma ile düzenlenir.

TABLO 14.1 Cdk İnhibitörleri

İnhibitör	Cdk/siklin kompleksi	Etkilenen evre
Cip / Kip ailesi (p21, p27, p57)	Cdk4/siklin D	G_1
	Cdk6/siklin D	G_1
	Cdk2/siklin E	G_1/S
	Cdk2/siklin A	S
Ink4 ailesi (p15, p16, p18, p19)	Cdk4/siklin D	G_1
	Cdk6/siklin D	G_1

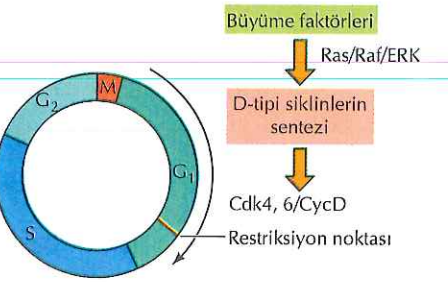
fosforillenmesini kapsar. Örnek olarak, Cdc2 ve Cdk2'nın ikisi de, omurgalılarda tirozin-15 ve komşu treonin-14'ün fosforillenmesi inhibe edilir. Bu Cdk'lar daha sonra, Cdc25 protein fosfataz ailesinin üyeleri tarafından, bu amino asitlerin defosforillenmesiyle ile aktifleşirler.

Cdk'ların fosforillenmesi yoluyla regülasyonuna ek olarak, aktiviteleri, inhibitör proteinlerin (**Cdk inhibitörleri** ya da **CKI** olarak adlandırılır) Cdk/siklin komplekslerine bağlanması yoluyla da kontrol edilebilir. Memeli hücrelerinde, iki Cdk inhibitör ailesi, farklı Cdk/siklin komplekslerinin düzenlenmesinden sorumludur (Tablo 14.1). Ink4 ailesinin üyeleri özel olarak Cdk4 ve Cdk6'ya bağlanır ve inhibe ederler, yani Ink4 CKI'lar G_1'deki restriksiyon noktasından geçişi inhibe ederler. Buna karşın, Cip/Kip ailesinin üyeleri ise, Cdk2, 4 ve 6'nın siklin A, D ve E ile yaptıkları komplekslere bağlanarak, G_1 ve S evreleri boyunca ilerlemenin tüm basamaklarını denetlerler. İlginçtir ki, Cip/Kip ailesi üyeleri Cdk2'nin siklin A ve E ile yaptığı kompleksleri baskılar, fakat Cdk4 ve Cdk6'nın siklin D ile yaptığı kompleksleri aktive eder ve böylece, CKI'ların Cip/Kip ailesi, hücre döngüsünün farklı evrelerinde hem aktivatör hem de inhibitör olarak ikili rol oynar. Cdk inhibitörlerinin denetimi, Cdk aktivitesinin kontrolü için ek bir mekanizma sağlar. Çok sayıdaki Cdk denetim biçiminin birleşik etkileri, hem kontrol noktalarının kontrolüne, hem de hücre çoğalmasını düzenleyen hücre-dışı çeşitli uyarılara yanıt olarak, hücre döngüsü kontrolünden sorumludur.

Büyüme Faktörleri ve D-Tipi Siklinler

Daha önce tartışıldığı gibi, hayvan hücrelerinin çoğalması, çoğunlukla, G_1'in geç safhasındaki restriksiyon noktasından hücrelerin ilerlemesini kontrol eden, çeşitli hücre-dışı büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Büyüme faktörlerinin yokluğunda, hücreler restriksiyon noktasını geçemezler ve durağan (quiescent) hale gelirler, çoğunlukla G_0 olarak bilinen dinlenme durumuna geçerler, bu durumdan çıkmaları ve tekrar hücre döngüsüne girmeleri ancak büyüme faktörü uyarılarına cevaben gerçekleşir. Hücre döngüsü ilerlemesinin hücre-dışı büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmesi, büyüme faktörü reseptörlerinin (önceki bölümde tartışıldı) uyardığı hücre-içi sinyal yolaklarının, sonunda, hücre döngüsü mekanizmasının bileşenlerini denetlediği anlamına gelir.

Büyüme faktörü sinyal iletimi ve hücre döngüsünün işleyişi arasında önemli bir ilişki D-tipi siklinler ile sağlanmıştır (Şekil 14.19). Siklin D sentezi Ras/Raf/ERK yolağıyla iletilen büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak başlar ve büyüme faktörlerinin varlığı süresince sentez devam eder. Ancak, D-tipi siklinler çok çabuk



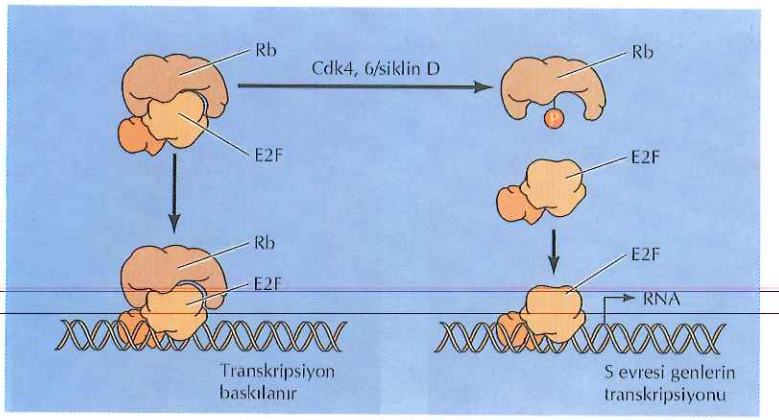
Şekil 14.19 D- tipi siklinlerin uyarılması
Büyüme faktörleri, Ras / Raf / ERK sinyal yolağı aracılığıyla, D- tipi siklin sentezini uyararak, hücre döngüsünün G_1'deki restriksiyon noktasında ilerlemesini sağlar.

parçalandıkları için, büyüme faktörleri ortamdan çekildiğinde hücre-içi konsant-rasyonları hızla azalır. Yani, G_1'de, büyüme faktörleri bulunduğu sürece Cdk4, 6/siklin D kompleksleri hücrelerin restriksiyon nokta-sından geçişini sağlar. Diğer yandan, eğer hücre döngüsünün bu kilit düzenlenme noktasından önce büyüme faktörleri ortamdan uzaklaşırsa, siklin D seviyeleri hızla düşer ve hücreler G_1'den S'ye geçemeyerek G_0'a girerler ve durağan hale gelirler. D-tipi siklinlerin uyarılabilirliği ve hızlı dönüşüm özelliği, hücre döngüsü mekanizması ile büyüme faktörü sinyali arasında bağlantı kurar ve böylece, hücre-dışı büyüme faktörlerinin, hücrelerin G_1'den ilerlemesini kontrol etmelerine olanak sağlar.

Siklin D, büyüme faktörü sinyal iletiminin önemli hedeflerinden biri olduğundan, tahmin edilebileceği gibi, siklin D regülasyonundaki bozukluklar, kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan kontrolsüz çoğalmaya neden olur. Bu beklentiye uygun olarak, insan kanserlerinin çoğunun, hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar sonucu, diğer büyük bir kısmının da büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilen hücre-içi sinyal yolaklarındaki anormalliklerden kaynaklandığı bulunmuştur (bkz Bölüm 13). Örneğin, lenfomalar ve meme kanserleri de dahil birçok insan kanserinin gelişimine, siklin D1'in sürekli, kontrol edilemeyen ekspresyonu ile sonuçlanan mutasyonlar katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, Cdk4, 6/siklin D komplekslerine bağlanan Ink4 Cdk inhibitörlerini (örn., p16) inaktive eden mutasyonlara da, insan kanser hücrelerinde sıklıkla rastlanmaktadır.

Siklin D, büyüme kontrolü ve kanser arasındaki bağlantıyı kuvvetlerinden diğer bir gerçek de, geniş çeşitlilikteki insan tümörlerinde, Cdk4, 6/siklin D komplekslerinin önemli bir substrat proteininin sıklıkla mutasyona uğramış olmasıdır. **Rb** olarak simgelenen bu protein, ilk kez, nadiren görünen çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastomdan sorumlu bir genin ürünü olarak tanımlanmıştır (bkz Bölüm 15). Daha sonraki çalışmalar, fonksiyonel Rb protein eksikliğine yol açan mutasyonların, sadece retinoblastom ile sınırlı olmadığını, yaygın insan kanserlerinin çoğunda da rol oynadığını göstermiştir. Rb, inaktivasyonunun tümör gelişimine yol açtığı gen olan, **tümör baskılayıcı gen** için bir prototiptir. Ras (bkz. Bölüm 13) ve siklin D gibi onkogen proteinler hücre çoğalmasını desteklerken, tümör baskılayıcı genlerden kodlanan proteinler, hücre döngüsü ilerlemesini yavaşlatan fren rolü oynarlar. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan hücre döngüsü düzenleyicilerine verilebilecek diğer örnekler, Ink4 Cdk inhibitörleri ve bu bölümde daha önce tartışılan, önemli çoğalma düzenleyicisi p53 dür.

Rb ile ilgili daha sonraki çalışmalar, DNA sentezi ve hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli genlerin ekspresyonu ile hücre döngüsü mekanizmasının eşleşmesi için Rb'nin anahtar rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 14.20). Hücreler döngüde ilerlerken, Rb'nin aktivitesi, fosforilasyonundaki değişikliklerle denetlenir. Örnek olarak, hücre G_1'deki restriksiyon noktasından geçerken, Rb Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosfatlanır. Fosfat eklenmemiş formdaki (G_0 da ya da G_1'in erken safhasında bulunur) Rb, siklin E'yi kodlayan gen de dahil olmak üzere, hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan birçok genin ekspresyonunu düzenleyen **E2F** transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerine bağlanır. E2F, Rb'nın varlığında ya da yokluğunda hedef dizilerine bağlanır. Ancak, Rb baskılayıcı rol oynar ve Rb/E2F kompleksi E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu engeller. Rb'nin Cdk4, 6/siklin D komplekleri tarafından fosforil-lenmesi, E2F'den ayrılmasına neden olur ve böylece, E2F hedef



Şekil 14.20 Hücre döngüsünün Rb ve E2F ile düzenlenmesi.
Fosfatlanmamış durumdaki Rb, E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılamak üzere, E2F ailesi üyelerine bağlanır. Rb'nin, G_1'in sonunda, Cdk4, 6/siklin D kompleksleri tarafından fosforillenmesi E2F'den ayrılmasına neden olur. Böylece, E2F, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerinde ekspresyonu uyarır.

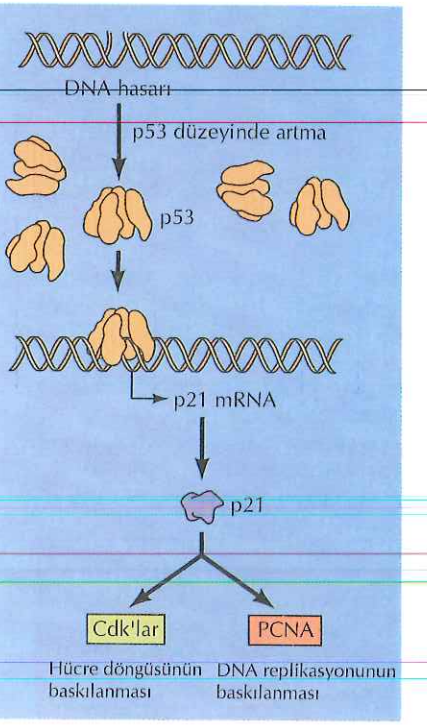
genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Rb, bu yolla, hücre döngüsü ilerlemesinde gerekli genler üzerinde etkili olan E2F'nin, baskılayıcıdan aktivatöre dönüşünü sağlayan bir çeşit moleküler şalter gibi hareket eder. Rb'nin Cdk4, 6/siklin D fosfatlanması yoluyla kontrolü, gen ekspresyonundaki bu ciddi kontrol ile, büyüme faktörlerinin G_1'deki varlığını bağdaştırır.

Hücre Döngüsü İnhibitörleri

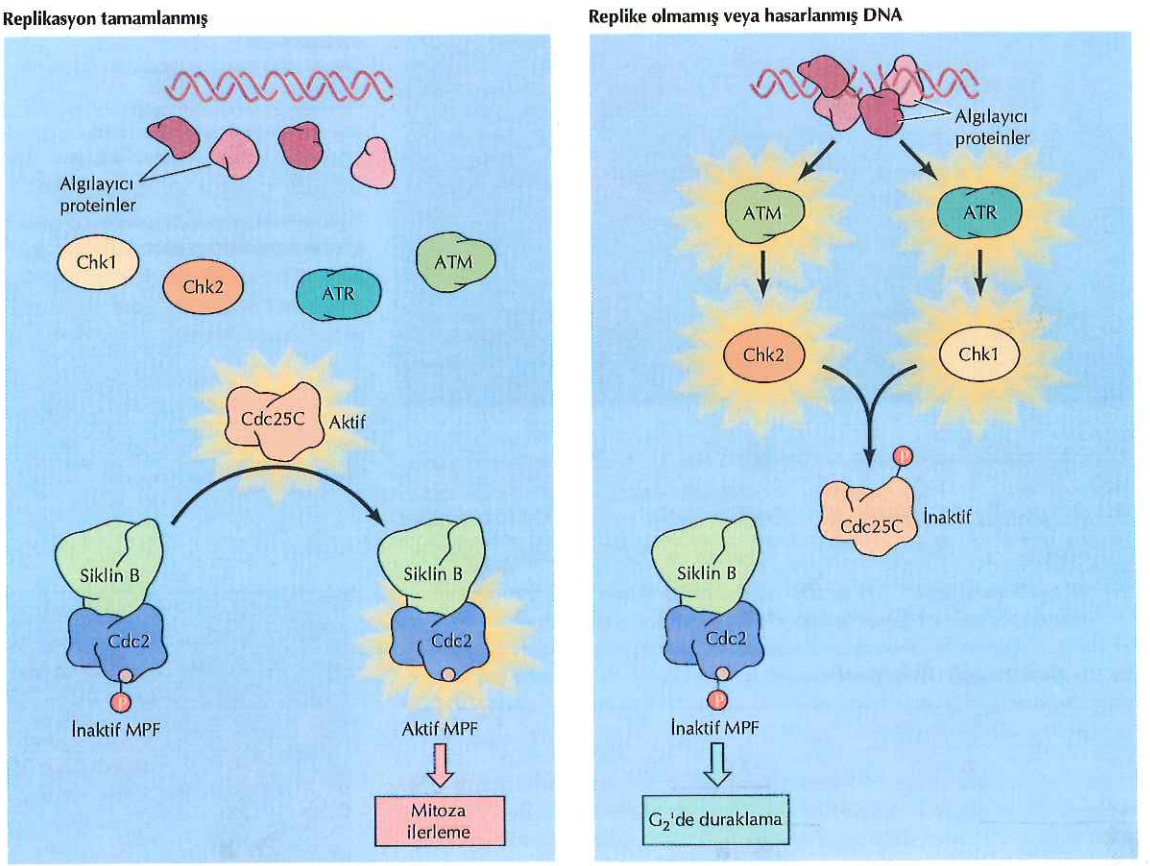
Hücre çoğalması sadece büyüme faktörleri tarafından değil, aynı zamanda, hücre döngüsü ilerlemesini baskılayan bir grup farklı sinyal tarafından da denetlenir. Örneğin, DNA hasarına yol açan etmenler, hücre döngüsünün duraklamasına neden olur, ki bu da hücreye hasarı onarmak için zaman tanır. Bunun dışında, hücrelerin birbirine dokunuşları ve çeşitli hücre dışı faktörler, hedef hücrelerinin çoğalmasını uyarmak yerine baskılarlar. Bu tür engelleyici sinyaller, ayrıca, hücre döngüsü mekanizmasının düzenleyicileri aracılığıyla, çoğunlukla Cdk inhibitörlerinin devreye sokulması ile de etki gösterirler.

G_1 kontrol noktasında DNA hasarına cevaben p53 proteini aracılığı ile hücre döngüsünün duraklatılması (bu bölümde daha önce sözü edildi), Cdk inhibitörlerinin etkisine uygun bir örnektir. Transkripsiyonel düzenleyici olarak fonksiyon gören p53 proteini, en azından kısmen, Cdk inhibitörü p21'in ekspresyonunu uyarır (Şekil 14.21). p21 proteini birçok Cdk/siklin kompleksini inhibe eder ve p53 tarafından uyarılması, DNA hasarını takiben p53'e bağlı hücre döngüsü duraklatılmasının mekanizmalarından sadece biridir. Cdk'lar ile etkileşerek hücre döngüsü ilerlemesini baskılamasının yanı sıra, p21 DNA replikasyonunu direk olarak da baskılayabilir. Örnek olarak, p21, DNA polimeraz δ'nın bir alt birimi olan ve Bölüm 5'de tartışılan, çoğalan hücre nükleer antijeni'ne (PCNA) bağlanır. Böylelikle p21, DNA hasarı ile uyarılan hücre döngüsü duraklatılmasında ikili rol oynar, hücre döngüsünü, sadece ilerlemesini engelleyen Cdk'lar vasıtasıyla değil, aynı zamanda S evresindeki hücrelerin DNA replikasyonunu doğrudan baskılayarak da durdurur.

Hayvan hücre çoğalmasının en iyi tanımlanmış hücre dışı inhibitörü, hücre döngüsünü G_1'de durdurarak, çeşitli epitel hücrelerin çoğalmasını baskılayan bir polipeptid faktör olan TGF-β'dır. TGF-β'nın bu etkisi, Cdk4, 6/siklin D komplekslerine bağlanan Cdk inhibitörü p15'in uyarılmasıyla sağlanır. Sonuçta, Cdk4, 6 aktivitesinin ortadan kalkması, Rb'nin fosfatlanmasını engeller ve hücre döngüsü G_1'de durur.



Şekil 14.21 p21'in DNA hasarıyla uyarılması
DNA hasarı, hücre içi p53 düzeyinde artışa neden olur ve o da, Cdk inhibitörü p21'i kodlayan genin transkripsiyonunu başlatır. Cdk / siklin komplekslerine bağlanarak hücre döngüsü ilerleyişini durdurmasının yanı sıra, p21, direkt olarak PCNA (DNA polimeraz δ'nın bir alt birimi) ile etkileşerek DNA sentezini durdurabilir.

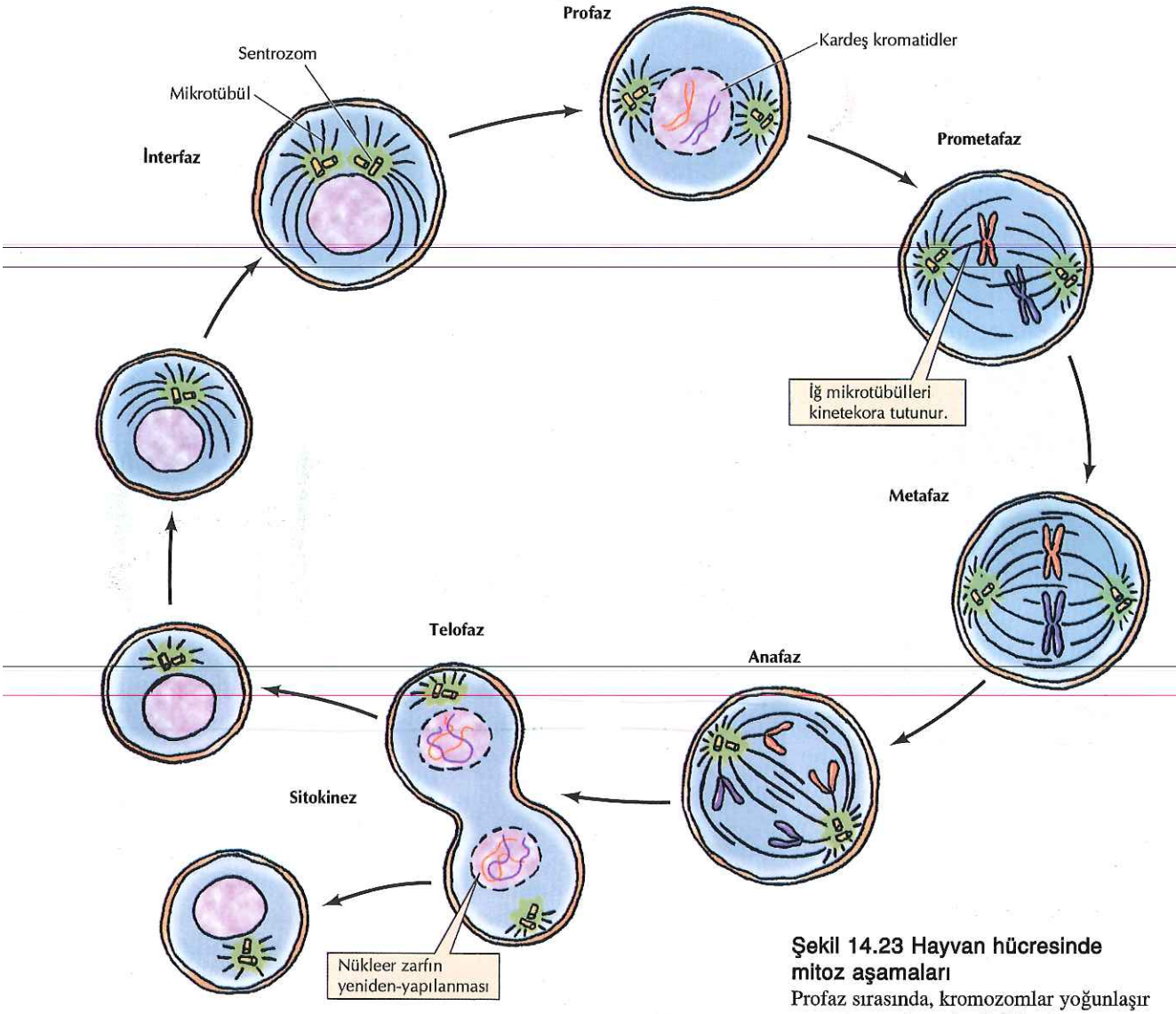


Şekil 14.22 G_2 kontrol noktasının denetimi
Bir algılayıcı proteinler kompleksi, hasarlı ya da replikasyonu tamamlamamış DNA'yı algılayarak, Chk1 ve Chk2 nin aktiflenmesini sağlayacak olan ATM ve ATR protein kinazları aktive eder. Chk1 ve Chk2 protein kinazlar, Cdc25C protein fosfatazı fosforilleyerek baskılarlar. Cdc25C'nin inhibisyonu, Cdc2'nin defosforillenmesini ve aktivasyonunu önler.

Hücre döngüsünü S ve G_2 denetim noktalarında kontrol etmek için, replike olmamış ya da hasara uğramış DNA'lara yanıt olarak hücre döngüsü ilerlemesini engelleyen, farklı bir moleküler mekanizma kullanılır. Bu bölümde daha önce tartışıldığı üzere, bu kontrol noktalarında hücre döngüsünün duraklatılması Chk1 ve Chk2 potein kinazlar tarafından sağlanır (bkz. Şekil 14.9). Chk1 ve Chk2, Cdc2/siklin B komplekslerinin defosforillenmesi ve dolayısıyla aktivasyonundan sorumlu olan protein fosfataz Cdc25C'yi fosfatlayarak inhibe eder (Şekil 14.22). Cdc2 aktive olmazsa, mitoza geçiş bloke olur ve hücre G_2'de durdurulur. Benzer şekilde, Chk1 ve Chk2, Cdc25 ailesinin diğer bir üyesi olan Cdc25A'yı fosfatlar. Cdc25A, S evresinin başlatılması ve devamından sorumlu olan Cdk2 ve siklin A veya E komplekslerini defosforile ve aktive eder. Fosforilasyon Cdc25A'nın hızla parçalanmasına neden olur, ki bu da DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün duraklaması ile sonuçlanır.

M Evresi Olayları

M evresi, hücre döngüsünün, hemen, hemen tüm hücre içeriğinin en geniş yeniden düzenlenmesini gerektiren en etkileyici evresidir. Mitoz (çekirdek bölünmesi) esnasında, kromozomlar yoğunlaşır, hücrelerin çoğunda nükleer zar yıkılır, mitotik iğleri oluşturmak üzere hücre iskeleti yeniden düzenlenir ve kromozomlar zıt kutuplara doğru hareket eder. Kromozomların ayrılmasını, genellikle, hücre bölünmesi (sitokinez) izler. Bu olayların çoğu daha önceki bölümlerde, nükleus ve hücre iskeleti yapı ve fonksiyonu açısından, tartışılmış olmakla birlikte, burada M evresi ile MPF'nin ilişkileri bağlamında yeniden gözden geçirilecektir.

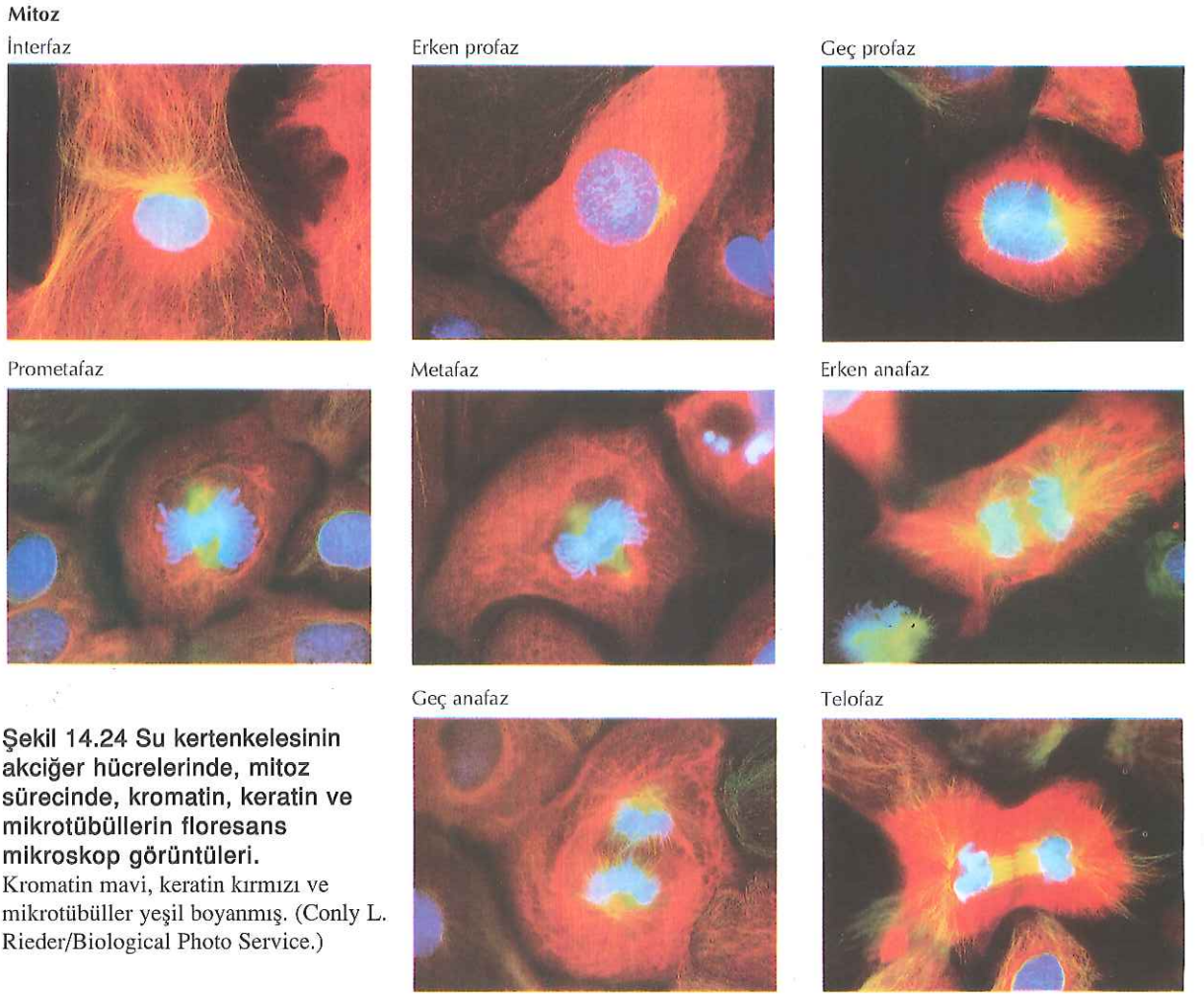


Şekil 14.23 Hayvan hücresinde mitoz aşamaları
Profaz sırasında, kromozomlar yoğunlaşır ve sentrozomlar mitotik iğin oluşumunu başlatmak üzere, nükleusun zıt yönlerine hareket eder. Daha sonra, çekirdek zarfının yıkılması ile, iğ mikrotübülleri kromozomların kinetokorlarına tutunabilir. Prometafaz sırasında, kromozomlar, sentrozomlar ile hücre merkezi arasında gidip gelir ve sonunda iğin ortasına dizilirler (metafaz). Anafazda, kardeş kromatidler ayrılarak, iğin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. Mitoz, daha sonra telofazda, nükleer zarfın yeniden oluşması ve kromozomların yoğunluk kaybetmesiyle sonlanır ve sitokinez ile, interfazda iki yavru hücre elde edilir. Her yavru hücrenin tek bir sentrozom aldığına dikkat ediniz. Sentrozom, bir sonraki mitoz öncesinde ikilenir.

Mitozun Aşamaları

Mitozun detaylarının çoğu, farklı organizmalar arasında değişiklik gösterse de, kardeş kromatidlerin güvenilir şekilde ayrılmalarını sağlayan temel süreç tüm ökaryotlarda korunmuştur. Mitozun bu temel olayları, kromozom yoğunlaşmasını, mitotik iğin oluşumunu ve kromozomların iğ mikrotübüllerine tutunmasını kapsar. Kardeş kromatidler, daha sonra birbirinden ayrılır ve iğin zıt kutuplarına hareket ederler, bunu, yavru nükleusların oluşumu izler.

- Mitoz geleneksel olarak dört evreye ayrılır – **profaz, metafaz, anafaz** ve **telofaz** – bunlar, hayvan hücresi için Şekil 14.23 ve 14.24'de resimlenmiştir. Profaz, her biri iki kardeş kromatidden (S evresinde üretilmiş olan yavru DNA molekülleri) oluşan kromozomların yoğunlaşmasıyla başlar. Bu yeni replike olmuş DNA molekülleri S ve G_2 boyunca birbirine dolanmış durumdadır, kromatin yoğunlaşması sürecinde çözülürler. Yoğunlaşan kardeş kromatidler **sentromer** bölgesinde (Bölüm 4'de tartışıldığı gibi) bir arada tutulur.



Şekil 14.24 Su kertenkelesinin akciğer hücrelerinde, mitoz sürecinde, kromatin, keratin ve mikrotübüllerin floresans mikroskop görüntüleri.
Kromatin mavi, keratin kırmızı ve mikrotübüller yeşil boyanmış. (Conly L. Rieder/Biological Photo Service.)

Sentromer, iğ mikrotübüllerinin bağlanma bölgesi olan **kinetokoru** oluşturmak üzere proteinlerin bağlandıkları bir DNA dizisidir. Kromozom yoğunlaşması dışında, mitotik iğin oluşmasını sağlayan sitoplazmik değişiklikler de profaz sırasında başlar. **Sentrozomlar** (interfazda çiftlenmiş olan) birbirinden ayrılır ve nükleusun zıt yanlarına hareket ederler. Profazın sonunda oluşmaya başlayan **mitotik iğ**'in iki kutbu olarak görev yaparlar.

Yüksek ökaryotlarda, profazın sonunda nükleus zarfı yıkılır. Ancak, Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, nükleer zarfın yıkılması mitozun genel özelliği değildir. Örnek olarak, mayalar ve diğer birçok tek hücreli ökaryotlarda, nükleer zarfın bütün olarak kaldığı 'kapalı mitoz' görülür (bkz Şekil 8.30). Bu hücrelerde iğin kutup cisimleri nükleer zarfın içinde gömülüdür ve yavru kromozomların, iğin zıt kutuplarına göçünden sonra, nükleus ikiye bölünür.

Profazın tamamlanmasından sonra, hücre, profaz ile metafaz arasında bir geçiş dönemi olan **prometafaza** girer. Prometafaz sırasında, mitotik iğin mikrotübülleri, yoğunlaşmış kromozomların kinetokorlarına tutunur. Kardeş kromatidlerin kinetokorları, kromozomun aksi yönlerinde yer alır ve böylelikle iğin zıt kutuplarından çıkan mikrotübüllere bağlanırlar. Kromozomlar, son

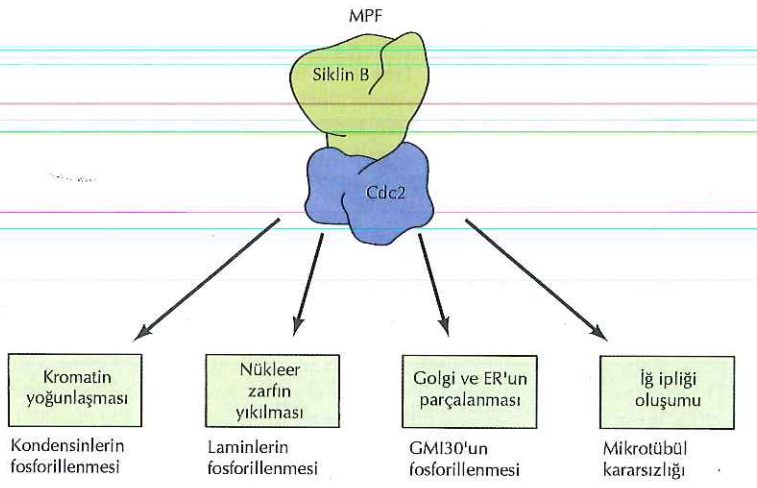
olarak iğin merkezindeki metafaz yörüngesine dizilinceye kadar, ileri geri yer değiştirirler. Bu evrede hücre metafaza ulaşmış olur.

Hücrelerin çoğu, anafaza girmeden önce metafazda sadece kısa bir süre için kalırlar. Metafazdan anafaza geçiş, birbirinden ayrılıp iğin zıt kutuplarına hareket edecek olan kardeş kromatidler arasındaki bağın kırılmasıyla tetiklenir. Mitoz, nükleusların yeniden oluştuğu ve kromozomların yoğunluğunun kaybolduğu, telofaz ile sonlanır. Sitokinez, genellikle geç anafaz esnasında başlar ve iki, yavru interfaz hücresi oluşturmak üzere, telofazın sonunda tamamlanır.

MPF ve Metafaza İlerleme

Mitoz, hücrenin bir çok bileşeninde, hücrenin yapısal bütününün yeniden organizasyonuna yol açacak kadar dramatik değişiklikler gerektirir. Bu bölümde daha önce tartışıldığı gibi, bu olaylar MPF protein kinazın (Cdc2/siklin B) aktivasyonu ile başlatılır. MPF sadece, M evresi geçişinin ana düzenleyicisi olarak, ileri aşamalardaki diğer protein kinazları fosfatlayıp aktive ederek rol oynamaz, aynı zamanda hücresel yeniden yapılanmada görev alan yapısal proteinlerin bazılarını da direkt olarak fosforile eder (Şekil 14.25).

İnterfaz kromatininin yoğunlaşarak, mitotik hücrelerdeki sıkıca paketlenmiş kromozomları oluşturması, mitozun anahtar olayıdır. Bu olay, kromozomların birbirine dolaşmadan ya da kırılmadan mitotik iğ boyunca hareket edebilmelerine olanak sağlaması açısından önemlidir. Bölüm 4'de tartışıldığı gibi, interfaz nükleusunun içindeki kromatin, metafaz kromozomlarını oluşturmak üzere, yaklaşık bin kat yoğunlaşır. Bu kadar yoğunlaşmış kromatinin transkripsiyonu mümkün değildir, bu nedenle, kromatin yoğunlaşması gerçekleştiğinde transkripsiyon durur. Bu olayın temel önemine rağmen, metafaz kromozomlarının yapısını ya da kromatin yoğunlaşmasının moleküler mekanizmasını henüz tam olarak anlayabilmiş değiliz. Ancak, kromatin yoğunlaşmasının, kondensin olarak adlandırılan ve Bölüm 8'de ele aldığımız, SMC (*s*tructural *m*aintenance of *c*hromatin: kromatinin yapısal korunması) protein ailesinin üyelerini kapsayan,



Şekil 14.25 MPF'nin hedefleri

M evresinin başında MPF, hem kondensin ve nükleer lamin gibi proteinleri fosforilleyerek hem de diğer protein kinazları aktive ederek, çok sayıda nükleer ve sitoplazmik değişikliği başlatır.

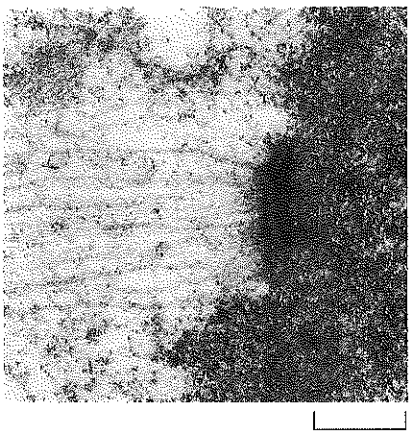
protein kompleksler tarafından yürütüldüğü saptanmıştır. Kondensinler direkt olarak, hücreler mitoza girdiğinde kondensinleri aktifleştirerek kromatin yoğunlaşmasını uyaran, Cdc2 protein kinaz tarafından fosforillenirler. Kromozom yoğunlaşmasına genellikle eşlik eden bir moleküler değişiklik de histon H_1'in fosforillenmesidir, yani, histon H_1 de bir Cdc2 substratıdır. Ancak mitotik kromozom yoğunlaşması için histon H_1 fosfatlanmasına gerek yoktur. Bu yüzden Cdc2 tarafından H_1'in fosforillenmesinin önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun aksine, kromozom yoğunlaşması için histon H_3'ün fosforillenmesi gerekir, ki bunların, kondensinleri topladığı düşünülmektedir. Beklenmedik şekilde, histon H_3'ün fosfatlanması, Cdc2 tarafından değil, mitoz sırasında aktifleşen diğer bir protein kinaz (aurora B) tarafından sağlanır.

Mitozun en önemli olaylarından birisi olan nükleer zarfın yıkımı, MPF etkisinin en iyi tanımlanan hedefidir. Bölüm 8'de tartışıldığı gibi, Cdc2, laminleri fosfatlayarak, doğrudan, nükleer laminanın depolimerizasyonuna yol açar (bkz Şekil 8.31). Bu olayı, çekirdek zarının küçük veziküllere parçalanması izler, ki bunlar, sonunda telofazda yeni yavru nükleusları oluşturmak üzere tekrar kaynaşırlar. Benzer şekilde, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı da, sitokinezde yavru hücrelere dağıtılmak üzere, küçük keseciklere bölünürler. Bu zarların parçalanması da MPF tarafından başlatılır ve kısmen Golgi matriks proteini GM130'un Cdc2 tarafından fosforillenmesi ile gerçekleşir. GM130, COPI-kaplı veziküllerin Golgi zarına yanaşması için gereklidir. Cdc2 tarafından GM130'un fosforillenmesi ve inaktivasyonu veziküllerin yanaşma ve kaynaşmasını baskılayarak Golgi aygıtının parçalanmasına öncülük eder. Ancak, Cdc2'nin bununla ilgili başka hedefleri de bulunabilir ve MPF'nin zar parçalanmasına yol açma mekanizması halen tam olarak açıklanamamıştır.

Mitotik iğin oluşumuyla en son noktaya erişen, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, mikrotübüllerin dinamik kararsızlığının sonucudur (bkz. Bölüm 11). Profazın başlangıcında sentrozomlar çekirdeğin zıt taraflarına hareket ederler. MPF aktivitesindeki artış daha sonra, mikrotübüllerin hareket dinamiğinde çarpıcı bir değişikliğe neden olur. İlk olarak, mikrotübüllerin yıkımında artış olur, bu da interfaz mikrotübüllerinin ayrışmasına ve kısalmasına neden olur. Bu ayrışmanın, MPF'nin kendisi ya da MPF'nin aktifleştirdiği protein kinazlar tarafından gerçekleşen, mikrotübülle ilişkili proteinlerin fosfatlanması neticesinde olduğu düşünülmektedir. Bunun dışında, sentrozomlardan çıkan mikrotübüllerin sayısı artar, böylelikle interfaz mikrotübüllerinin yerini, sentrozomlardan yayılan çok sayıdaki kısa mikrotübüller alır.

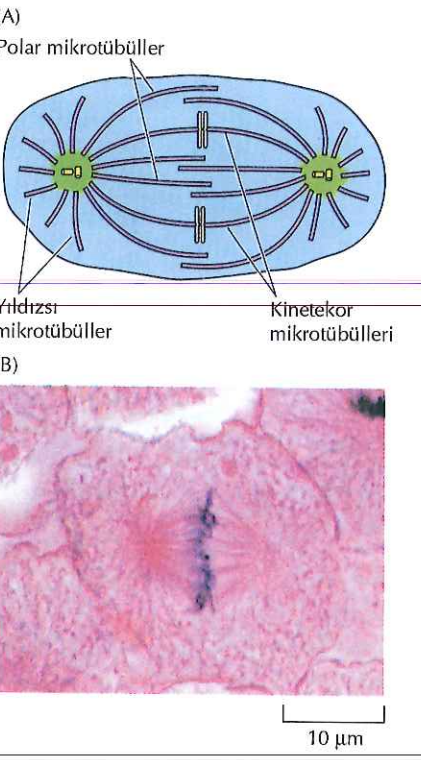
Çekirdek zarının yıkılması, bazı iğ mikrotübüllerinin, kromozomlara kinetokorlarından tutunmasına (Şekil 14.26) ve prometafaz için tanımlayıcı olan, kromozom göçünün başlamasına olanak sağlar. Kinetokorda toplanan proteinler, kromozomların hareketini sentrozoma bağlı iğ mikrotübüllerinin eksi uçlarına doğru yönelten mikrotübül motorlarını içerir. Kromozomları sentrozomlara doğru çeken bu proteinlerin hareketine, artı uç yönelimli motor proteinler ve kromozomları iğin kutuplarından uzaklaştıran mikrotübül uzaması karşı koyar. Sonuç olarak, prometafazdaki kromozomlar, sentrozomlar ve iğ merkezi arasında ileri geri yer değiştirirler.

İğin zıt kutuplarından gelen mikrotübüller, sonunda, kardeş kromatidlerin iki kinetokoruna (kromozomun iki yanında yerleşik olan) tutunur ve kromozomlar üzerine etki eden kuvvetlerin



Şekil 14.26 Bir kromozomun kinetokoruna tutunmuş mikrotübüllerin elektron mikroskop görüntüsü
(Conly L. Rieder / Biological Photo Service.)

Şekil 14.27 Metafaz iği
(A) İğ üç farklı mikrotübül çeşidinden oluşur. Kinetokor mikrotübülleri kromozomlara tutunur, kutup mikrotübülleri hücrenin merkezinde çakışırlar ve yıldızsı mikrotübüller sentrozomdan hücrenin kenarlarına doğru yayılırlar. (B) Bir tatlı su balığının (whitefish) metafazdaki hücresi. (B, Michael Abbey/Photo Researchers, Inc.)

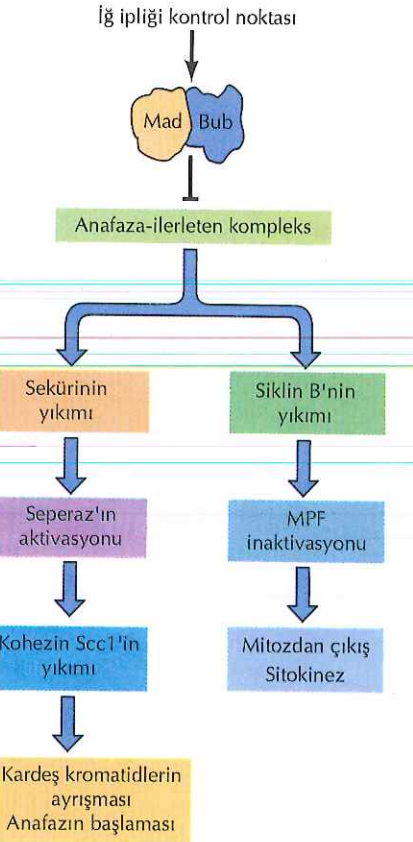


dengelenmesi, bunların iğin merkezindeki metafaz düzleminde dizilmesini sağlar (Şekil 14.27). Bölüm 11'de tartışıldığı gibi iğ, hem kromozomlara tutunan **kinetokor mikrotübülleri**, hem de hücrenin ortasında birbirinin üstüne oturan **polar mikrotübülleri** içerir. Buna ek olarak, **yıldızsı mikrotübüller** sentrozomlardan hücre kenarlarına doğru yayılırlar.

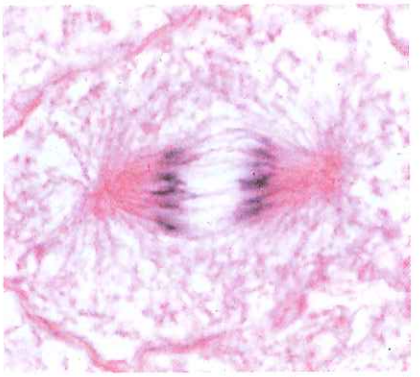
Proteoliz ve MPF'nin İnaktivasyonu: Anafaz ve Telofaz

Bu bölümde daha önce de tartışıldığı gibi, bir başka önemli hücre döngüsü kontrol noktası, kromozomların metafaz iği üzerinde dizilmelerini denetler. Bu süreç başarıyla tamamlandığında, hücre anafaza ilerler ve mitozu bitirir. Metafazdan anafaza geçiş, düzenleyici anahtar proteinlerin, **anafaza-ilerleten kompleks** olarak adlandırılan bir ubikütin ligazın (bkz Şekil 7.41) aktivasyonu ile tetiklenen, ubikütin-aracılıklı protein yıkımı sonucu gerçekleşir. Anafaza-ilerleten kompleksin aktivasyonu, mitozun başlangıcında MPF tarafından başlatılır, yani MPF sonuç olarak kendi yıkımını da tetiklemiş olur. Anafaza-ilerleten kompleks, hücre iğ kontrol noktasını geçene kadar etkisiz kalır, bundan sonra, ubikütin-yıkım sisteminin etkinleşmesi, metafazdan anafaza geçişi ve mitozu tamamlamak üzere ilerlemeyi sağlar.

İğ kontrol noktası, sıraya girmemiş tek bir kromozom varlığının dahi, anafaza-ilerleten kompleksin aktivasyonunu baskılamak için yeterli oluşuyla olağanüstüdür. Bu kontrol noktasının işlevinden sorumlu biyokimyasal mekanizma halen tam olarak anlaşılamamakla birlikte, serbest kromozomların, anafaza-ilerleten kompleksi baskılayan protein komplekslerinin (Mad/Bub proteinleri olarak adlandırılırlar) üretimini tetiklediği anlaşılmaktadır (Şekil 14.28). Kromozomların tamamı uygun olarak dizildiğinde baskılanma ortadan kalkar ve bu da anafaza-ilerleten kompleksin aktivasyonuna ve iki anahtar hedef proteinin yıkılmasına yol açar. Anafazın başlangıcı, metafaz düzlemi üzerinde dizildiklerinde kardeş kromatidler arasındaki bağlantıyı sağlayan, **kohezinler** olarak adlandırılan protein komplekslerinin bir bileşeni olan Scc1 proteininin proteolitik yıkımı sonucunda olur. Scc1'in yıkımı, anafaza-ilerleten kompleksin direkt kataliziyle değil, separaz olarak adlandırılan bir proteazın düzenleyici alt birimi olan sekürin isimli proteini yıkmasıyla sağlanır. Sekürin'in yıkımı separazın aktivasyonuyla sonuçlanır ki, bu da kohezin Scc1'i yıkar. Scc1'in kesilmesi, kardeş kromatidler arasındaki bağlantıyı kırar ve iğin zıt kutuplarına doğru hareket ederek ayrılmalarına olanak verir



Şekil 14.28 Siklin B proteoliz sisteminin hedefleri
Anafaza-ilerleten kompleks, hücre iğ kontrol noktasından geçinceye kadar, Mad/Bub proteinleri tarafından baskılanan bir ubükitin ligazdır. Anafaza-ilerleten kompleksin aktivasyonu, kardeş kromatidler arasındaki bağlantıyı koparacak olan kohezin Scc1'in yıkımına ve böylece metafazdan anafaza geçişe neden olur. Anafaza-ilerleten kompleks ayrıca, MPF'nin inaktivasyonuna, mitozdan çıkışa ve sitokineze yol açmak üzere, siklin B'nin yıkımını da sağlar.



Şekil 14.29 Bir tatlısu balığının (whitefish) anafazdaki hücresi
(Michael Abbey / Photoresearchers, Inc.)

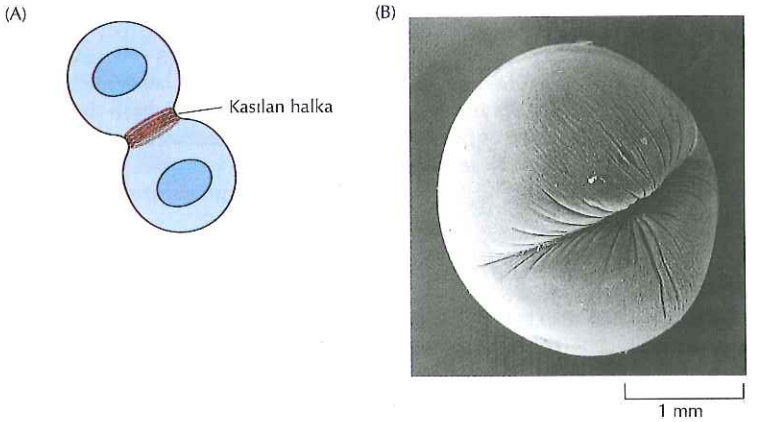
(Şekil 14.29). Kromozomların anafaz sürecinde ayrılmaları, iğ mikrotübülleri ile ilintili bir kaç motor protein tipinin etkinliği sonucu ilerler (bkz. Şekil 11.51 ve 11.52).

Anafaza-ilerleten kompleks tarafından ubikütinlenme ve yıkım için hedeflenmiş diğer bir düzenleyici anahtar protein, siklin B'dir. Siklin B'nin yıkımı, hücrenin mitozdan çıkması ve interfaza geri dönmesi için gerekli olan MPF'nin inaktivasyonuna sebep olur. Bu geçişlerde yer alan hücresel değişikliklerin çoğu, mitoza giriş sırasında MPF tarafından başlatılan olayların bir anlamda tersidir. Örneğin, çekirdek zarfının yeniden toparlanması, kromatin yoğunluğunun azalması ve mikrotübüllerin interfaz durumuna geri dönüşleri gözlenir. Tüm bunlar, olasılıkla, mitozun başında MPF tarafından fosforillenen proteinlerin fosfatlarının uzaklaştırılması ve MPF aktivitesinin kaybının sonucudur. Biraz sonra tartışacağımız gibi MPF'nin inaktivasyonu sitokinezi de tetikler.

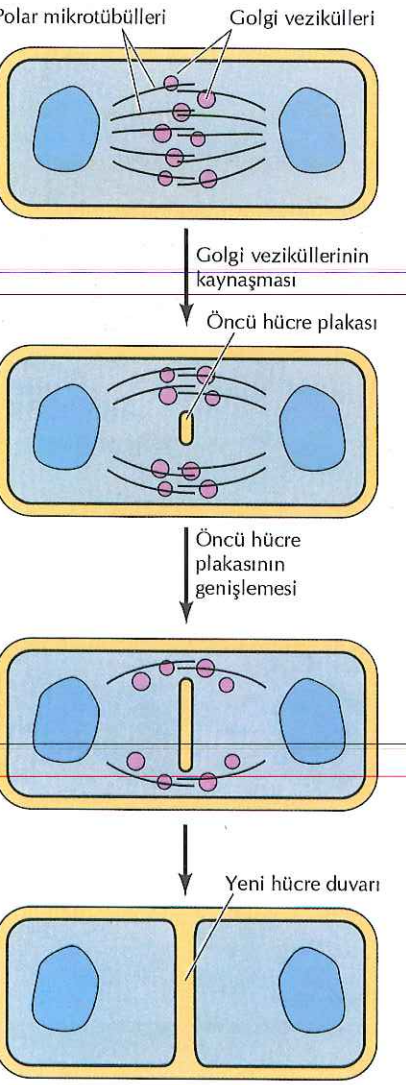
Sitokinez

Mitozun tamamlanmasına, çoğunlukla, iki yavru hücrenin oluşumuna neden olan sitokinez eşlik eder. Sitokinez genellikle anafazın başlamasından hemen sonra başlar ve MPF'nin inaktivasyonu ile tetiklenir, böylelikle hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölünmesi eş zamanlı olur. Bölüm 11'de tartışıldığı gibi, hayvan hücrelerinin sitokinezi, plazma zarının altında, aktin ve miyozin II filamanlarından oluşan **kasılan halka** ile sağlanır (Şekil 14.30). Bu halkanın yerleşimi, mitotik iğin pozisyonu ile belirlenir, yani, sonunda hücre iğe dik, metafaz düzleminden geçen bir çizgide bölünür. Yarılma, aktin-miyozin filamanlarının kasılması sonucu plazma zarının içeri çekilmesiyle devam eder ve sonunda hücre ortasından daralır. İki yavru hücresinin arasındaki köprü kırılır ve plazma zarı tekrar kapatılır.

Sert hücre duvarlarıyla çevrili gelişmiş bitki hücrelerinde sitokinez mekanizması farklıdır. Bu hücreler, daralan halka ile ortasından boğumlanarak değil, hücrenin içinde plazma zarı ve yeni hücre duvarı oluşturarak bölünürler (Şekil 14.31). Erken telofazda, hücre duvarı öncüllerini taşıyarak Golgi aygıtından çıkan kesecikler, iğ mikrotübüllerine bağlanır ve metafaz düzleminin önceki konumunda birikirler. Bu kesecikler daha sonra büyük, zarla-çevrilmiş, disk benzeri yapı oluşturmak üzere kaynaşırlar ve içerdikleri polisakkaridler, yeni hücre duvarının (**hücre plakası** adı verilir) matrisini oluşturmak üzere birleşir. Hücre plakası, iğe dik olarak,



Şekil 14.30 Hayvan hücresi sitokinezi
(A) Sitokinez, aktin ve miyozin filamanlarından oluşmuş bir halkanın, hücreyi ikiye bölecek şekilde daralmasıyla gerçekleşir. (B) Sitokineze giren bir kurbağa yumurtasının taramalı elektron mikroskop fotoğrafı. (B, David M. Phillips / Visuals Unlimited).



Şekil 14.31 Yüksek bitkilerde sitokinez
Hücre duvarı öncülerini taşıyan Golgi vezikülleri, daha önce metafaz plağının bulunduğu yerde, polar mikrotübüllere bağlanırlar. Veziküllerin birbirine kaynaşması sonucunda, dışa doğru genişleyerek atasal plazma zarıyla birleşecek olan, zarla çevrili disk şeklinde bir yapı ortaya çıkar (öncü hücre plakası).

plazma zarına ulaşıncaya kadar, dışa doğru genişler. Daha sonra, hücre plakasını çevreleyen zar, başlangıçtaki hücreye ait plazma zarı ile birleşerek hücreyi ikiye böler.

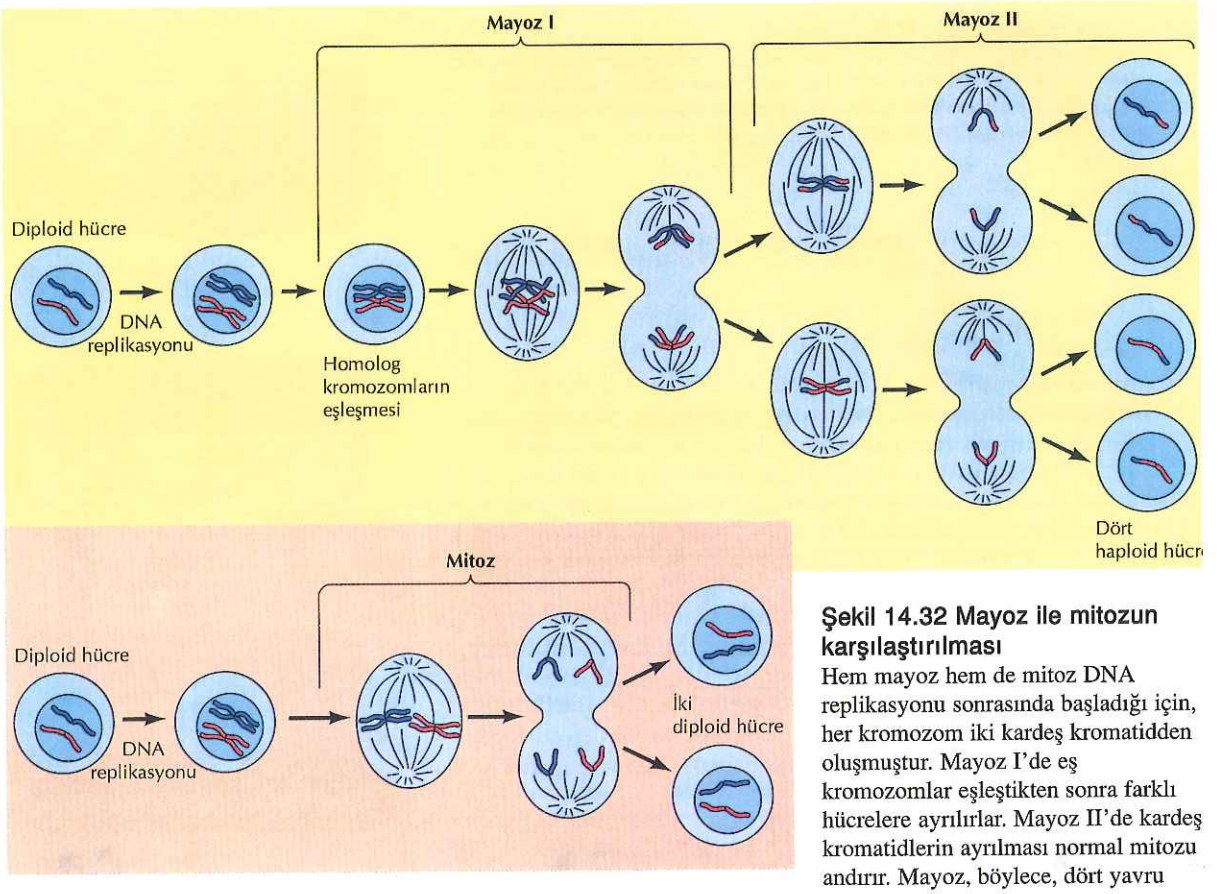
Mayoz ve Döllenme

Bu bölümde şu ana kadar tartışılan somatik hücre döngüleri, aynı miktarda genetik materyale sahip, diploid yavru hücrelerle sonuçlanır. Mayoz ise, kromozom sayısını yarıya indirerek haploid yavru hücrelerin oluşumuyla sonlanan, özelleşmiş bir tür hücre döngüsüdür. Mayalar gibi tek hücreli ökaryotlar, mitoz yoluyla üreyebildikleri gibi mayoza da girebilirler. Örneğin; diploid *Saccharomyces cerevisiae*, uygun olmayan çevre koşullarına maruz kaldığında mayoza girerek sporlar üretir. Çok hücreli bitki ve hayvanlarda ise, mayoz sadece, eşeyli üreme için gerekli olan üreme hücreleriyle sınırlıdır. Somatik hücreler çoğalmak için mitoza girerken, üreme hücreleri haploid eşey hücrelerini (sperm ve yumurta) oluşturmak üzere mayoza girerler. Yeni döl canlının gelişimi, döllenme sırasında bu eşey hücrelerinin kaynaşması ile başlar.

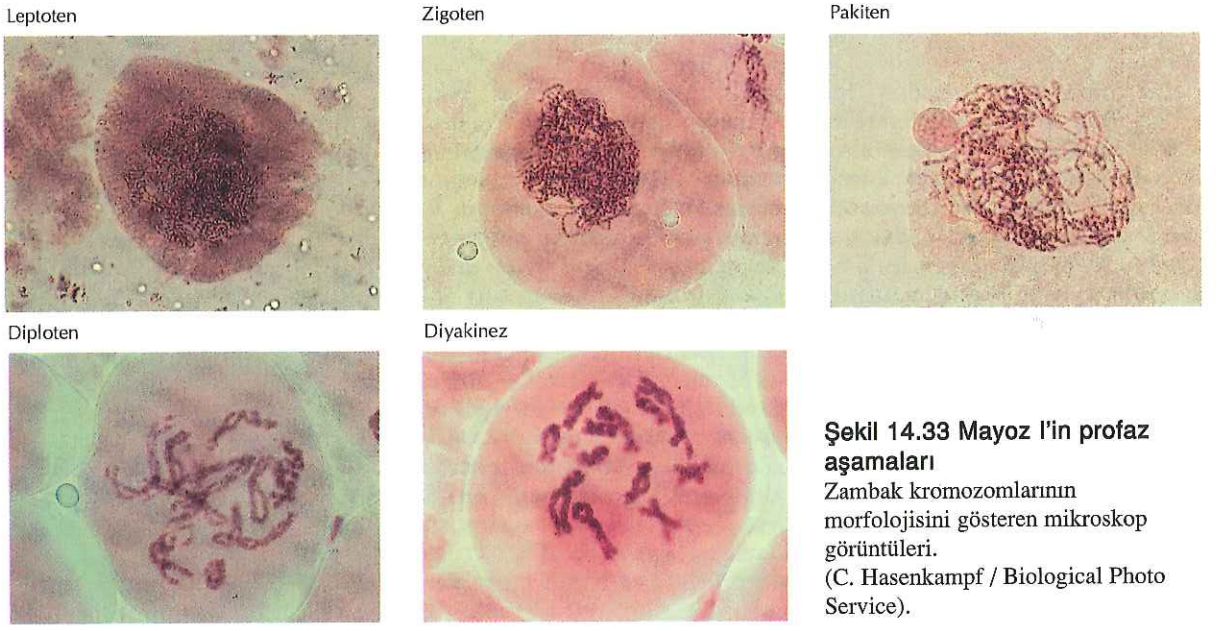
Mayoz Süreci

Mitozun aksine, **mayoz**, bir diploid parental hücrenin, her biri diploid ebeveynin homolog kromozom çiftlerinden yalnız birini taşıyan, haploid yavru hücrelere bölünmesiyle sonlanır (Şekil 14.32). Kromozom sayısındaki bu azalma, tek bir DNA replikasyon turunu izleyen, art arda iki nükleus ve hücre bölünmesi (mayoz I ve mayoz II olarak adlandırılır) ile sağlanır. Mitoz gibi, mayoz I de, S evresi tamamlandıktan ve parental kromozomlar identik kardeş kromotidleri oluşturmak üzere replike olduktan sonra başlar. Ancak, mayoz I'deki kromozom dağılım modeli mitozdakinden oldukça farklıdır. Mayoz I sırasında, homolog kromozomlar önce birbiriyle eşleşir ve sonra farklı yavru hücrelere ayrışırlar. Kardeş kromatidler bir arada kalırlar, böylelikle mayoz I'in tamamlanması, her kromozom çiftinin bir üyesine (iki kardeş kormatidden oluşan) sahip yavru hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanır. Mayoz I'i, kardeş kromatidlerin ayrılması ve farklı yavru hücrelere dağılması ile mitozu andıran, mayoz II izler. Mayoz II'nin tamamlanması ile, her biri her kromozomun tek bir kopyasına sahip, dört haploid yavru hücre oluşur.

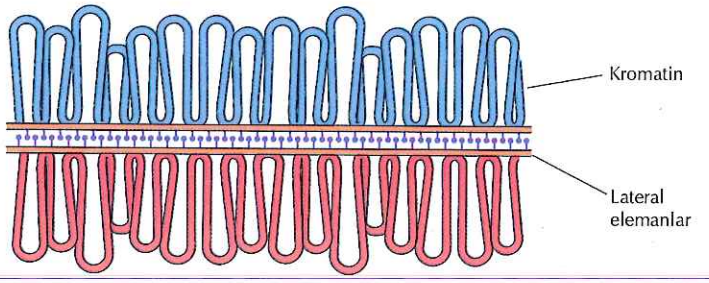
DNA replikasyonundan sonra homolog kromozomların eşleşmesi, babadan ve anneden gelen kromozomlar arasındaki rekombinasyonun sonucudur. Yani genetik rekombinasyon, mayoz esnasındaki kromozom dağılımı ile yakından ilişkilidir. Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon, mayoz I'deki uzun ve kromozom morfolojisine göre beş evreye ayrılan (**leptoten, zigoten, pakiten, diploten** ve **diyakinez**) profaz sırasında gerçekleşir (Şekil 14.33). Mayoz sırasında rekombinasyon oldukça sık görülür, yüksek oranda korunmuş bir endonükleaz olan Spo11 tarafından, mayotik profazın erken evresinde (leptoten) indüklenen çift iplik kırılmaları ile



Şekil 14.32 Mayoz ile mitozun karşılaştırılması
Hem mayoz hem de mitoz DNA replikasyonu sonrasında başladığı için, her kromozom iki kardeş kromatidden oluşmuştur. Mayoz I'de eş kromozomlar eşleştikten sonra farklı hücrelere ayrılırlar. Mayoz II'de kardeş kromatidlerin ayrılması normal mitozu andırır. Mayoz, böylece, dört yavru haploid hücre oluşmasını sağlar.



Şekil 14.33 Mayoz I'in profaz aşamaları
Zambak kromozomlarının morfolojisini gösteren mikroskop görüntüleri.
(C. Hasenkampf / Biological Photo Service).

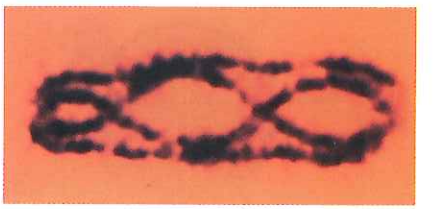


Şekil 14.34 Sinaptonemal kompleks
Kromatin halkaları, birbirine fermuar benzeri bir yapıyla bağlanan, lateral elemanlara tutunur.

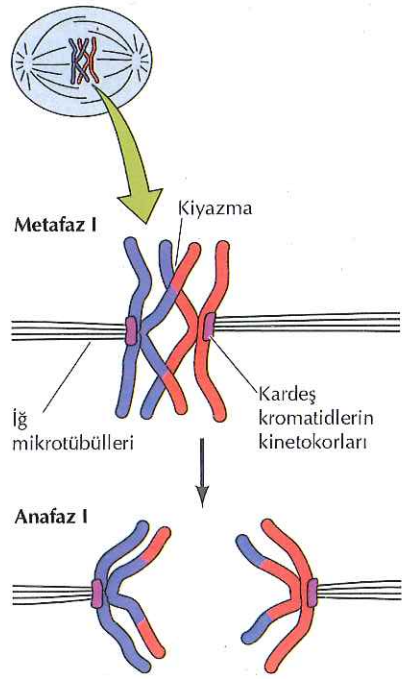
başlatılır. Bölüm 5'de tartışıldığı gibi, çift iplik kırılmaları, komplemanter baz eşleşmesi ile homolog kromozomun içine uzanan tek iplikli bölgelerin oluşmasına yol açar (bkz. Şekil 5.36). Homolog kromozomların belli noktalarda birbirleriyle yakın birlikteliği (**sinaps**), zigoten aşamasında başlar. Bu aşamada, eşleşmiş kromozomların uzunluğu boyunca, **sinaptonemal kompleks** olarak isimlendirilen fermuar benzeri protein yapı oluşur (Şekil 14.34). Bu kompleks, birkaç gün sürebilen pakiten evresi boyunca homolog kromozomları bir arada ve yan yana tutar. Homolog kromozomlar arasındaki rekombinasyon, pakiten'in sonunda, çapraz-değişim noktalarından (**kiyazmata**; tekili, kiyazma) bağlı kromozomlar bırakarak tamamlanır. Sinaptonemal kompleks diploten evresinde kaybolur ve homolog kromozomlar tümüyle birbirinden ayrılır. Ancak, kiyazmata ile bağlı kalırlar ve bu, metafazda doğru dizilmeleri için gereklidir. Bu aşamada her kromozom çifti (bivalan olarak adlandırılır) belirgin kiyazmata noktalarıyla, dört kromatid içerir (Şekil 14.35). Profaz I'in son evresi olan diyakinez, metafaza geçişin habercisidir ve bu evrede kromozomlar tamamen yoğunlaşırlar.

Metafaz I'de bivalan kromozomlar iğ üzerinde dizilirler. Mitozun aksine (bkz Şekil 14.27), kardeş kromatidlerin kinetokorları, birbirine bitişik ve aynı yöne bakarken, homolog kromozomların kinetokorları iğin zıt kutuplarına bakar (Şekil 14.36). Dolayısıyla, iğin aynı kutbundan gelen mikrotübüller kardeş kromatidlere tutunurken, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller homolog kromozomlara tutunurlar. Anafaz I, homolog kromozomları birleştiren kiyazmatanın ayrılmasıyla başlar. Sonrasında, kardeş kromatidler sentromerlerinden bağlı kalırken, homolog kromozomlar birbirinden ayrılır. Mayoz I'in tamamlanmasıyla, her yavru hücre, her bir homolog çiftin, iki kardeş kromatidden oluşan bir üyesine sahip olur.

Sitokinezin hemen ardından, çoğunlukla, kromozomlar yoğunluklarını tamamen kaybetmeden önce, mayoz II başlar. Mayoz I'in aksine, mayoz II normal mitozu andırır. Metafaz II'de kromozomlar, zıt kutuplarından gelen mikrotübüller kardeş



Şekil 14.35 Diploten aşamasındaki bir bivalan kromozom
Bivalan kromozom, eşleşen eş kromozomlardan oluşur. Her kromozomun kardeş kromatidleri sentromerde birbirine bağlıdır. Eş kromozomların kromatidleri, genetik yeniden düzenlenmelerin gerçekleştiği bölgeler olan, kiyazmalarda birbirine bağlıdır. (B. John / Visuals Unlimited.)



Şekil 14.36 Mayoz I'de kromozomların ayrışması
Metafaz I'de kardeş kromatidlerin kinetokorları birbirine birleşik ya da bitişiktir. Bu nedenle, iğin aynı kutupundan gelen mikrotübüller kardeş kromatidlerin kinetokoruna tutunurken, zıt kutuplardan gelen mikrotübüller, eş kromozomların kinetokorlarına tutunur. Kiyazmalar anafaz I'de açılır ve eş kromozomlar iğin zıt kutuplarına hareket ederler.

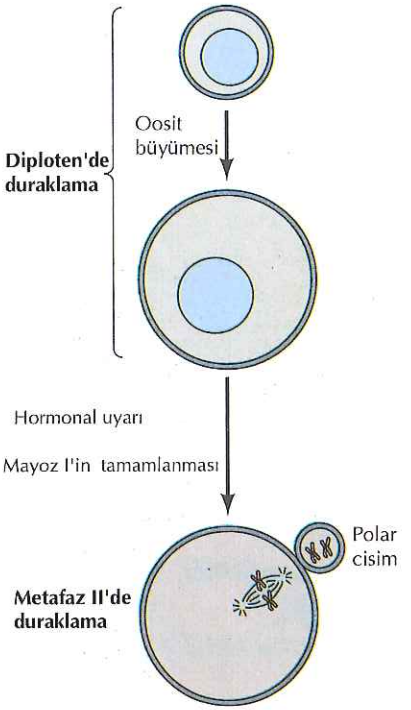
kromatidlerin kinetokorlarına tutunmuş olarak, iğin üzerinde dizilirler. Kardeş kromatidlerin sentromerleri arasındaki bağ anafaz II'de açılır ve kardeş kromatidler zıt kutuplara dağılırlar. Bunu, haploid yavru hücrelerin oluşumunu sağlayan, sitokinez izler.

Oosit Mayozunun Düzenlenmesi

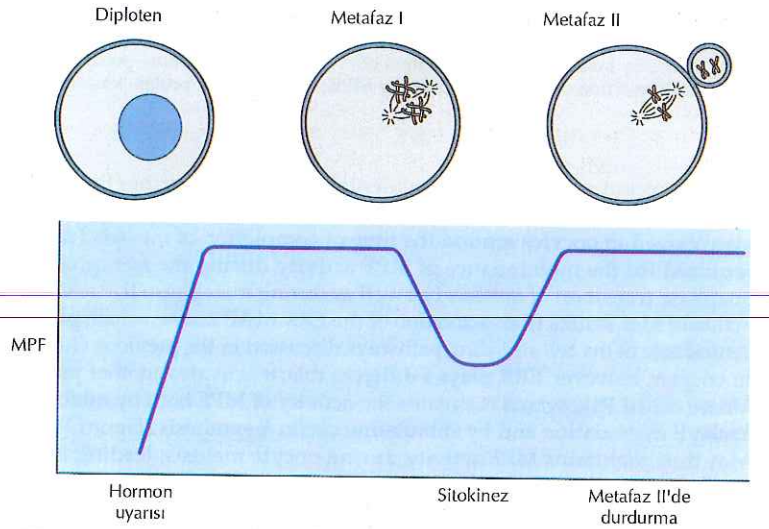
Omurgalı oositleri (gelişen yumurtalar) özellikle büyüklükleri ve laboratuardaki kullanım kolaylıkları nedeniyle, hücre döngüsü araştırmalarında yararlı model olmuşlardır. Dikkate değer bir örnek olarak, bu bölümde önceden ele alınmış olan, MPF'nin kurbağa oositlerinde keşfi ve daha sonra da saflaştırılması gösterilebilir. Diğer türlerde olduğu gibi, bu oositlerin mayozu, hücre döngüsünde iki özel noktada düzenlenir ve oosit mayozu çalışmaları, yeni hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına ışık tutmuştur.

Oosit mayozunun ilk düzenlenme noktası, birinci mayotik bölünmenin diploten aşamasındadır (Şekil 14.37). İnsanlarda, oositler bu aşamada 40 ila 50 yıl kadar uzun sürelerde bekleyebilir. Bu diploten duraklamasında, oosit kromozomları yoğunluk kaybederler ve aktif olarak transkribe olurlar. Bu transkripsiyonel aktivite, bu evrede oositlerin olağanüstü büyümelerinden anlaşılabilir. Örneğin, insan oositleri yaklaşık 100μm çapındadır (tipik bir somatik hücrenin hacminin yüz katından fazla). Kurbağa oositleri, yaklaşık 1mm çapları ile, daha da büyüktürler. Bu hücre büyümesi aşamasında oositler, embriyo gelişiminin erken evrelerinde gereksinim duyulacak olan, RNA ve protein gibi maddeleri stoklarlar. Bu bölümde daha önce bahsedildiği gibi, erken embriyonik hücre döngüleri hücre büyümesi olmadan gerçekleşir ve döllenmiş yumurta hızla küçük hücrelere bölünür (bkz. Şekil 14.2).

Farklı türlerin oositleri, mayozun tekrarlanacağı ve döllenmenin gerçekleşeceği süreler açısından çeşit arz ederler. Bazı hayvanlarda, oositler döllenince kadar diploten evresinde kalırlar ve ancak ondan sonra mayozu tamamlarlar. Ancak, omurgalıların çoğunun (kurbağalar, fareler ve insanlar gibi) oositleri, hormonal uyarıya yanıt olarak mayoza devam ederler ve döllenme öncesinde mayoz I'de ilerlerler. Mayoz I'i izleyen hücre bölünmesi, küçük bir **kutup cismi** ve büyük hacmini koruyan bir oosit oluşumuyla sonlanan, asimetrik bir bölünmedir. Oosit, daha sonra, yeni çekirdek oluşturmadan ve kromozomlarını açmadan, mayoz II'ye giriş için ilerler. Çoğu omurgalıların oositleri, daha sonra metafaz II'de tekrar duraklatılır ve döllenme oluncaya kadar burada bekletilir.



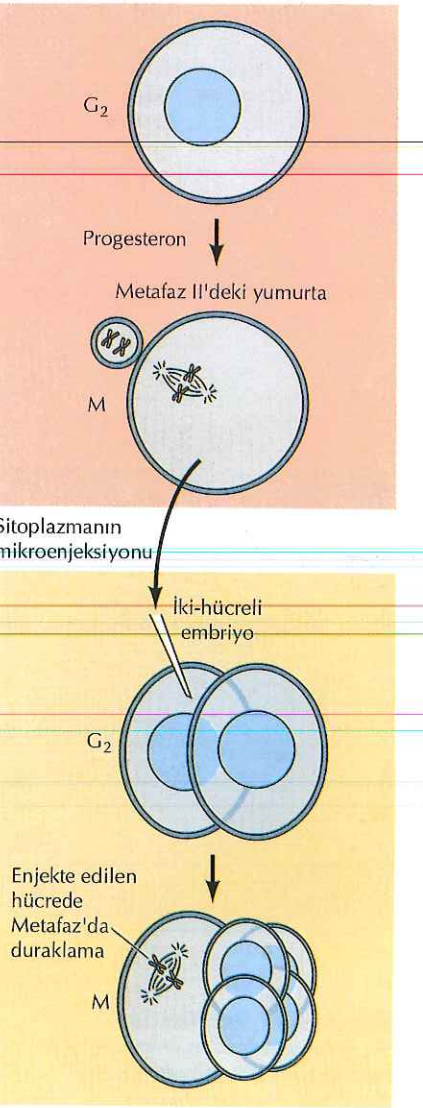
Şekil 14.37 Omurgalı oositlerinin mayozu
Mayoz diploten aşamasında durdurulur ve bu bekleme döneminde oosit büyür. Oosit daha sonra, hormonal uyarıya yanıt olarak, mayoza yeniden başlar ve ilk mayotik bölünmeyi, küçük bir kutup cismi oluşturan asimetrik sitokinezle tamamlar. Çoğu omurgalı oositleri metafaz II'de tekrar durdurulur.



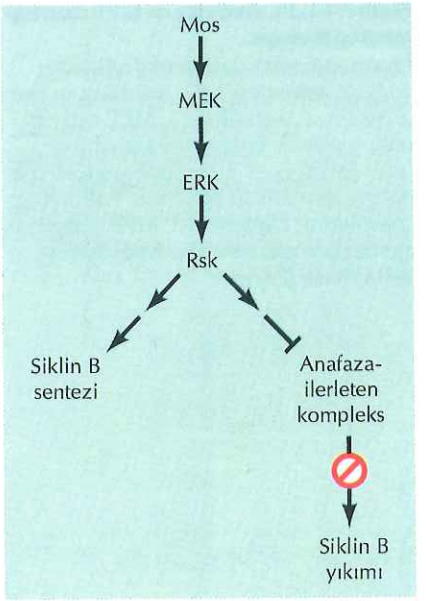
Şekil 14.38 Oosit mayozu sürecinde MPF aktivitesi
Diploten'de bekleyen oositin hormonal uyarımı, MPF'yi aktifleyerek metafaz I'e ilerlemeyi sağlar. MPF aktivitesi, metafaz I'den anafaz I'e geçerken, sadece kısmen azalır ve böylece, oosit M evresinde kalır. Mayoz I'in tamamlanmasını takiben MPF aktivitesi tekrar yükselir ve metafaz II duraklaması süresince yüksek kalır.

Somatik hücrelerin M evresi gibi, oositlerin mayozu da MPF tarafından kontrol edilir. Oosit mayozu sırasında MPF'nin kontrolü, mayoz I'den mayoz II'ye geçiş ve metafaz II'de duraklamadan sorumlu olması gibi, belirli özellikler gösterir (Şekil 14.38). Diploten'de durdurulmuş olan oositlerin hormonal uyarımı, ilk önce, somatik hücrelerin G_2'den M'ye geçişine benzer şekilde MPF'yi aktive ederek mayozun yeniden başlamasını tetikler. Mitozda olduğu gibi, MPF daha sonra, kromozom yoğunlaşmasını, çekirdek zarfının yıkımını ve iğin oluşumunu başlatır. Anafaza-ilerleten kompleksin aktivasyonu, MPF'nin aktivitesinin azalması ile birlikte, mayoz I'in metafazdan anafaza geçişini sağlar. Ancak, mitozun aksine, MPF aktivitesi sadece kısmen azalır, böylece oosit M evresinde kalır, kromatinler kalınlaşmış kalır ve nükleer zarf yeniden oluşmaz. Sitokinezi takiben, MPF aktivitesi tekrar yükselir ve yumurta metafaz II'de tutulduğu sürece yüksek kalır. Oositlere özgün kontrol mekanizması, bu şekilde, mayoz I'de metafazından anafaza geçiş ve bunu izleyen metafaz II duraklaması süresince, normal bir M evresinde siklin B proteolizi sonucunda gerçekleşen MPF inaktivasyonunu önleyerek, MPF aktivitesinin devamlılığını sağlar.

Metafaz II duraklamasından sorumlu faktör, ilk olarak 1971'de Yoshio Masui ve Clement Markert tarafından, MPF'nin keşfini sağlayan aynı deney serileriyle tanımlanmıştır. Ancak, burada, metafaz II'de durmuş bir yumurtanın sitoplazması, mitotik hücre döngüsü içerisinde olan bir erken embriyo hücresine enjekte edilmiştir (Şekil 14.39). Yumurta sitoplazmasının enjeksiyonu, embriyonik hücrenin metafazda durmasına sebep olmuştur, ki bu da metafaz duraklamasının, yumurtada bulunan bir sitoplazmik faktör tarafından uyarıldığını göstermektedir. Bu faktör mitozu duraksattığı için, **sitostatik faktör (CSF)** olarak adlandırılmıştır.



Şekil 14.39 Sitostatik faktörün tanımlanması
Metafaz II'deki bir yumurtanın sitoplazması, iki hücreli embriyonun bir hücresine, mikroenjeksiyonla aktarıldı. Enjekte edilen hücre metafazda durdurulurken, enjekte edilmeyen hücre bölünmeye devam etti. Metafaz II'deki yumurtanın sitoplazmasında bulunan bir faktör (sitostatik faktör), enjekte edildiği embriyo hücresinde metafaz aşamasındaki duraklamayı uyarıyordu.



Şekil 14.40 MPF aktivitesinin Mos protein kinaz tarafından korunması
Mos protein kinaz, hem ciklin B sentezini uyararak hem de, siklin B'nin anafaza-ilerleten kompleks tarafından yıkılmasını engelleyerek, MPF aktivitesini korur. Mos etkisini; MEK, ERK ve Rsk protein kinazlar aracılığıyla gösterir.

Yakın zamandaki bir çok araştırma, **Mos** olarak bilinen bir protein-serin/treonin kinazı, CSF'nin temel bileşeni olarak tanımlamıştır. Mos özellikle mayoz I'in tamamlanmasına yakın zamanda, oositlerde sentezlenir ve metafaz II'deki duraklama esnasında olduğu kadar mayoz I'in metafazından anafazına geçişinde gerekli MPF aktivitesinin korunması için gereklidir. Mos'un etkisi, önceki bölümde tartışılan hücre sinyal yolaklarında önemli bir role sahip ERK/ MAP kinazın aktivasyonu sonucunda ortaya çıkar. Ancak, oositlerde ERK'in rolü farklıdır; burada, MPF aktivitesinin devamlılığını, siklin B'nin hem yıkımını baskılayarak hem de sentezini uyararak koruyan ve Rsk olarak adlandırılan diğer bir protein kinazı aktive eder (Şekil 14.40). Bir başka deyişle Mos, oosit mayozu sırasında MPF'nin aktivitesini sürdürmesini sağlayarak, metafaz II'de oositin duraklamasına neden olur. Oositler mayotik hücre döngüsünün bu noktasında, döllenmeyi bekleyerek, birkaç gün durabilir.

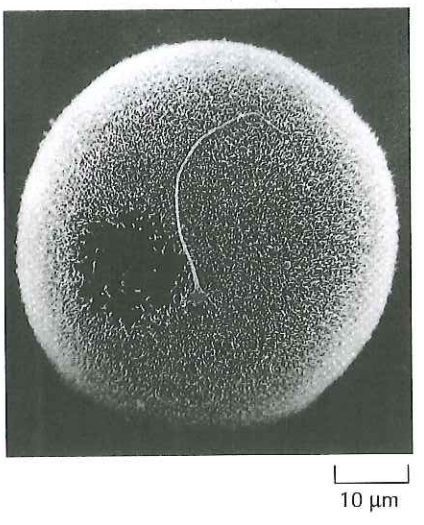
Döllenme

Döllenme esnasında, sperm, yumurta yüzeyindeki bir reseptöre bağlanır ve yumurtanın plazma zarıyla kaynaşarak, anne ve babadan gelen genetik bilgiyi içeren yeni diploid organizmanın oluşumunu başlatır (Şekil 14.41). Döllenme sadece babaya ve anneye ait kromozomların karışmasını değil, aynı zamanda yumurta sitoplazmasında, gelişminin ileri dönemlerinde kritik role sahip olacak bir seri değişikliği de başlatır. Bu değişiklikler yumurtayı aktifleştirerek, oosit mayozunun tamamlanmasına ve erken embriyonun mitotik hücre döngülerinin başlamasına yol açar.

Spermin, yumurtanın plazma zarı üzerindeki reseptörüne bağlanmasıyla başlayan önemli sinyallerden biri, yumurta sitoplazmasında Ca^{2+} seviyesindeki artışıdır ki, bu artış, olasılıkla, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP_2) hidrolizinin sonucudur (bkz. Şekil 13.27). Hücre içi Ca^{2+} seviyesindeki bu artışın bir etkisi, yumurtaya başka sperm girişini engelleyecek yüzey değişikliklerini başlatmaktır. Yumurtalar aynı anda çok sayıda spermle karşılaştıkları için, bu durum, normal diploid embriyonun oluşumunu sağlamak açısından kritik bir olaydır. Yüzeydeki bu değişiklikler, yumurta plazma zarının altında çok sayıda bulunan salgı keseciklerinin, Ca^{2+} tetiklemeli eksositozunun sonucudur. Bu keseciklerin içeriğinin serbest kalması sonucu, yumurta hücresi-dış yüzey katmanı değişir ve böylece bir başka spermin girişi önlenmiş olur.

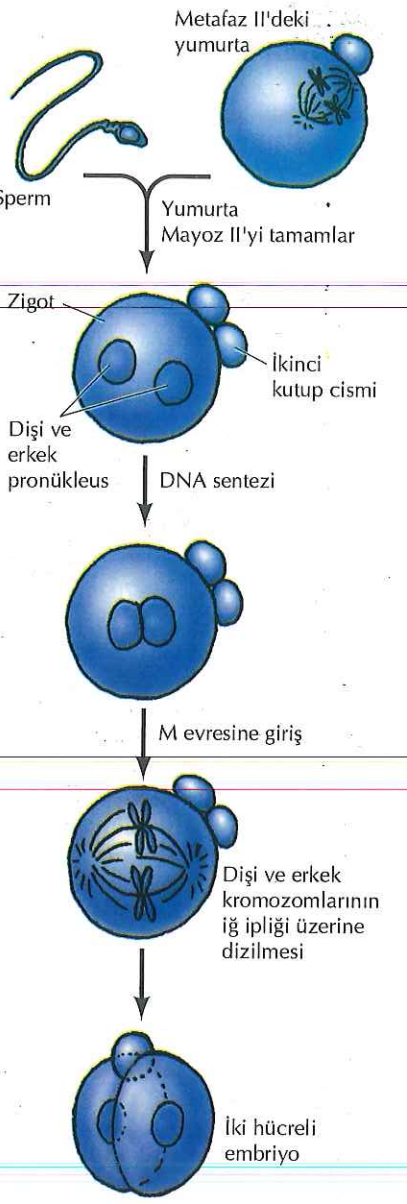
Döllenmeyi takiben, sitozoldeki Ca^{2+} artışı, aynı zamanda mayozun tamamlanması için de sinyal oluşturur (Şekil 14.42). Metafaz II'de durmuş yumurtalarda metafazdan anafaza geçiş, anafaza-ilerleten kompleksin Ca^{2+}-bağımlı aktivasyonu ile başlatılır. Sonuçta MPF'nin inaktivasyonu, ikinci küçük polar cisimciğin oluşumasına neden olan asimetrik sitokinez yoluyla (mayoz I'deki gibi), ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasını sağlar.

Oosit mayozunun tamamlanmasını takiben, döllenmiş yumurta (artık **zigot** olarak adlandırılır), her biri bir ebeveynden olmak üzere, iki haploid çekirdeğe (**pronükleus** olarak adlandırılır) sahiptir. Memelilerde, bu iki pronükleus, S evresine girer ve birbirlerine doğru



Şekil 14.41 Döllenme
Bir yumurtayı dölleyen insan sperminin taramalı elektronmikroskop görüntüsü. (David M. Philips / Visuals Unlimited.)

Şekil 14.42 Döllenme ve mayozun tamamlanması
Döllenme, metafaz II'den anafaz II'ye geçişi indükleyerek, oosit mayozunun tamamlanmasına ve ikinci kutup cisminin çıkışına (ki genellikle yıkılır) yol açar. Sperm çekirdeği yoğunluğunu kaybeder ve böylece döllenmiş yumurta (zigot) iki haploid nükleusa (dişi ve erkek pronükleus) sahip olur. Memelilerde iki pronükleus birbirine doğru hareket ederken DNA'larını kopyalarlar. Sonra, dişi ve erkek kromozomları ortak bir iğ üzerine dizilir ve mitoz başlar. Mitozun ve sitokinezin tamamlanmasıyla, her bir hücrenin diploid genoma sahip olduğu, iki-hücreli embriyo oluşur.



ilerlerken DNA'larını replike ederler. Birbirine ulaştıklarında, zigot ilk mitotik bölünmesi için M evresine girer. İki çekirdeğin de zarfı yıkılır, anne ve babadan gelen kalınlaşmış kromozomlar ortak iğ üzerinde dizilirler. Mitozun tamamlanması ile, her biri yeni diploid genom içeren iki embriyonik hücre oluşur. Bu hücreler, daha sonra, yeni bir organizmanın oluşumunu sağlayacak olan, bir seri embriyonik hücre bölünmesine başlarlar.

Kök Hücreler ve Erişkin Dokuların Korunması

Gelişimin erken döneminde embriyonik hücreler hızla çoğalırlar. Çoğalan hücreler daha sonra, çok hücreli hayvanların doku ve organlarını oluşturacak birçok özelleşmiş hücre tipini oluşturmak üzere farklılaşırlar. Hücreler farklılaştıkça, çoğalma hızları genellikle düştüğü gibi, erişkin hayvan hücrelerinin çoğu hücre döngüsünün G_0 evresinde dururlar. Farklılaşmış hücre tiplerinden bazıları bir daha asla bölünmez ve organizmanın yaşamı boyunca yok olanların yerlerine yenileri yapılamaz. Ancak, dokuların çoğunda yaralanma ya da hücre ölümü sonucu kaybedilen hücrelerin yerini almak üzere, çoğalma yeteneği bulunan hücreler bulunur. Buna ek olarak, bazı dokular, yetişkin hayvanlarda yüksek yıkılıma maruz kalan hücrelerin yenilenmesi için, yaşam boyu devamlı bölünebilen hücreler içerirler. Böylece, hücre çoğalması, doku ve organlardaki hücrelerin sayısını sabit tutmak için, hücre ölümüyle dengelenir.

Farklılaşmış Hücrelerin Çoğalması

Erişkin hayvan hücreleri, hücre çoğalması ve yenilenmesine göre üç genel kategoride gruplanabilir. İnsanlardaki kalp kası hücreleri gibi, farklılaşmış hücrelerin çok az bir kısmı, daha fazla bölünme yeteneğine sahip olmadıklarından, yaralanma ya da hücre ölümündeki kayıplarda yerine konamazlar. Bu hücreler embriyonik gelişim sırasında üretilir, farklılaşır ve hayvanın yaşamı boyunca kalırlar.

Farklılaşmış hücrelerin bazıları da çoğalma yeteneklerini korurlar. Bu hücreler hücre döngüsünün G_0 evresine girerler fakat hasara uğrayan ya da ölen hücrelerin yenilenme ihtiyacı olduğunda tekrar çoğalabilirler. Deri fibroblastları, düz kas hücreleri, kan damarların içini kaplayan endotel hücreleri ve karaciğer gibi bazı internal organların epitel hücreleri bu tip hücrelerdendir. Bu tip hücrelerin kontrollü çoğalmalarına örnek olarak, bu bölümde daha önce tartışılmış olan, kesik ya da yaralanma sonucu meydana gelen hasarların tamiri amacıyla deri fibroblastlarının hızla çoğalması gösterilebilir. Çarpıcı diğer bir örnek, normal olarak çok nadiren bölünen karaciğer hücrelerinde görülür. Karaciğer hücreleri çok büyük sayıda kaybolmuşsa (karaciğerin bir kısmının ameliyatla alınması gibi) kalan hücreler eksilen dokunun yenilenmesi için çoğalmak üzere uyarılırlar. Örneğin; sıçan karaciğerinin üçte ikisinin ameliyatla alınmasını, birkaç gün içerisinde karaciğerin tümüyle yenilenmesini sağlayan, hızlı hücre çoğalması izler.

ANAHTAR DENEY

Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Isolation of Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells

Gail R. Martin
University of California, San Francisco, CA

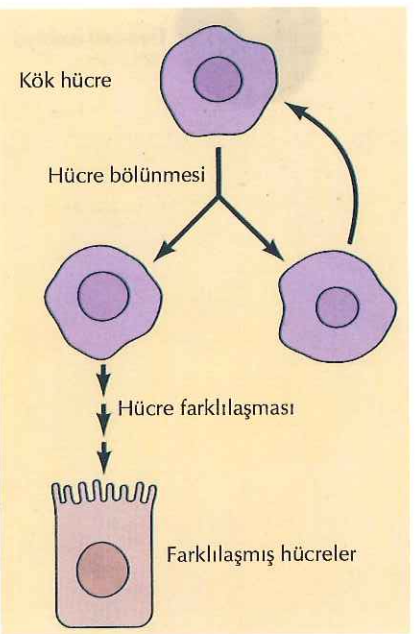
Proceedings of The National Academy of Science, USA, 1981, Volume 78, pages 7634-7638

Gail R. Martin

Bağlam

Erken embriyo hücreleri, çoğalma ve erişkin hayvanda doku ve organların tümünü oluşturabilecek hücrelere farklılaşabilme kapasitelerinden dolayı özeldirler. 1970 yılında, fare erken embriyosunun, rahimden çıkarılıp alakasız bölgelere aktarıldıklarında, sıklıkla tümör geliştirdikleri bulundu. Teratokarsinom adı verilen bu tümörler, hayvanda çoğaldıklarında bir dizi farklı doku oluşturabilme kapasitesinde hücreler içeriyorlardı. Ayrıca, teratokarsinom hücreleri (embriyonal karsinom hücreleri olarak da adlandırılır), izole edilip, hücre kültüründe üretilebiliyorlardı. Normal embriyo hücrelerini andıran bu hücreler, kültürde çeşitli hücre tiplerine farklılaşabiliyorlardı. Bazı embriyonal karsinom hücreleri, erken fare embriyolarına (blastosistler) enjekte edilerek taşıyıcı bir anneye aşılandıklarında, normal fare gelişimine katkıda bulunabiliyordu.

Embriyonal karsinom hücrelerinin, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmeleri ve normal fare gelişimine katılabilmeleri, tümör-kaynaklı bu hücrelerin, normal embriyonik kök hücrelerle yakın ilişkili olabileceklerini düşündürdü. Ancak, farede teratokarsinomların gelişimi sırasındaki olaylar bilinmiyordu. Gail Martin, teratokarsinomlarda bulunan embriyonal karsinom hücrelerinin aslında, rahimden çıkarılıp alakasız bölgelere aktarıldıkları ve normal farklılaşmayı başlatacak uygun sinyalleri alamadıkları için anormal çoğalan, normal embriyo hücreleri oldukları hipotezini savundu. Bu hipoteze dayanarak, normal embriyonik kök hücre hatları elde etmek amacıyla, fare embriyosundan hücre kültürleri yapmaya çalıştı. Onun deneyleri ve Martin Evans ile Matthew Kaufman'ın benzer çalışmaları (Establishment in culture

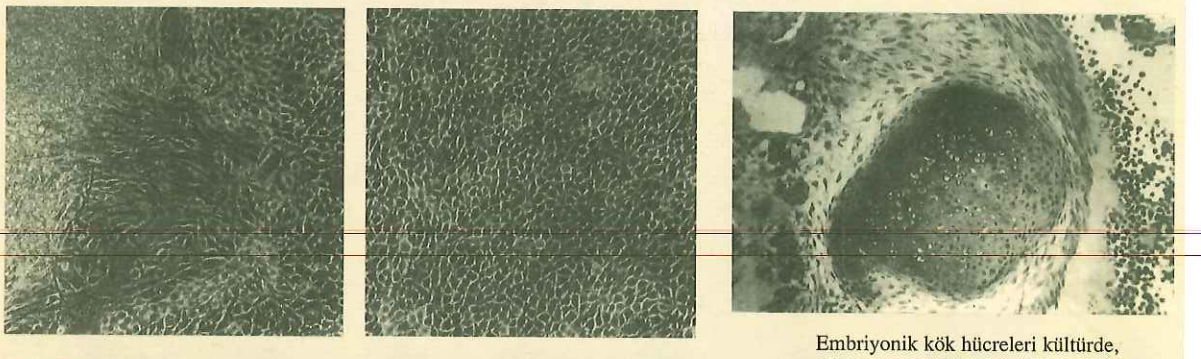


Ancak, farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin çoğu, hücre bölünme yeteneklerini kaybetmişlerdir, fakat, erişkin hayvanların dokularında bulunan ve kök hücreleri olarak adlandırılan daha az farklılaşmış hücrelerin çoğalması ile yenilenirler. Hayvanlarda yaşam boyu çoğalabilme ve farklılaşmış hücrelere dönüşebilme yeteneklerinden dolayı, kök hücreler, erişkin dokuların devamlılığını sağlamada kritik role sahiptirler.

Kök Hücreler

Kök hücrelerin en önemli özelliği, bölündüklerinde, farklılaşabilen ya da kök hücre olarak kalan, yavru hücreler üretmeleridir (Şekil 14.43). Kök hücrelerin bölünmesi, farklılaşmış yavru hücreler oluşturmasının yanı sıra, yeni kök hücre de üretebildiği için, kök hücreler kendi popülasyonlarını yenileyebildikleri gibi hayat boyu farklılaşmış hücrelerin üretimi için de kaynak olarak görev yapabilirler. Erişkin hayvanlarda, kısa yaşam süreleri olan ve sürekli hücre çoğalması ile yenilenmesi gereken, kan hücreleri, derinin epitel hücreleri ve sindirim kanalını kaplayan epitel hücreleri gibi, farklılaşmasını tamamlamış birçok hücre tipinde, kök hücrelerinin rolü açıktır. Bu koşulların

Şekil 14.43 Kök hücre çoğalması
Kök hücreler, biri kök hücre olarak kalacak, biri de farklılaşacak olan (örn., barsak epitel hücresine) iki hücre oluşturmak üzere bölünürler.



Embriyonik kök hücreleri kültürde, nöron-benzeri hücreler (A), endoderm hücreleri (B) ve kıkırdak (C) gibi, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler.

of pluripotential cells from mouse embryos, Nature, 1981, 292:154-156), kök hücrelerinin normal fare embriyosundan doğrudan kültüre edilebileceğini gösterdi. Bu embriyonik kök hücre dizilerinin izolasyonu, fare gelişim analizleri ve genetik kullanışlılık yanında, transplantasyon tedavilerinde insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı olasılığının da yolunu açtı.

Deneyler

Embriyonal karsinoma hücrelerinin normal embriyonik kök hücrelerinden geldikleri temeline dayanarak, Martin, normal fare blastosistlerinden kültür yapmaya girişti. Yaklaşık 30 embriyonun hücreleriyle başlayarak, bir haftalık kültür sonrasında, başlangıçta dört hücre kolonisi izole etti. Bu hücreler, tekrarlanan kültür pasajlarıyla bol miktarda elde edilebildi ve yeni fare embriyoları ile tekrarlanarak, benzer hücre dizileri oluşturuldu.

Normal embriyodan (embriyonik kök hücre) oluşan hücre dizileri, tümör kökenli embriyonal karsinom hücrelerine çok benziyordu. Daha da önemlisi, embriyonik kök hücreler kültürde, endoderm hücreleri, kıkırdak ve nöron-benzeri hücreler gibi, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabiliyorlardı (bkz. şekil). Ayrıca, embriyonik kök hücreler fareye enjekte edildiğinde, çeşitli farklılaşmış hücre tiplerini içeren tümörler gelişiyordu. Sonuçta, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğini koruyan embriyonik kök hücre dizilerinin, kültürde normal fare embriyosundan oluşturulabileceği anlaşılmış oldu.

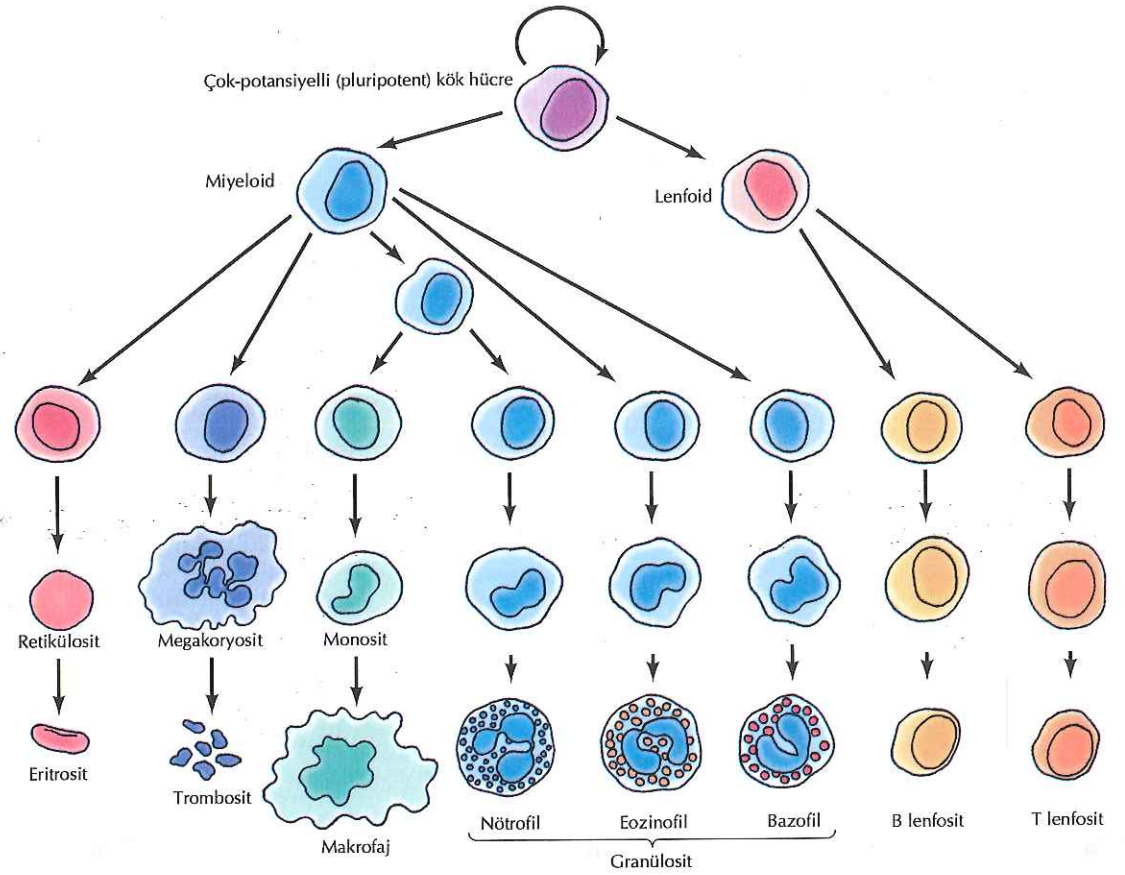
Etki

Embriyonik kök hücre dizilerinin oluşturulması, fare genetiği ve gelişimi çalışmalarına büyük etkisi yanı sıra, çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için yeni olanakların açılmasını da sağlamıştır. Sonraki çalışmalar, embriyonik kök hücrelerin, fare embriyosuna enjeksiyonu takiben, normal fare gelişimine katıldığını göstermiştir. Gen transfer teknikleri kültüre edilmiş embriyonik kök hücrelere mutant genleri nakletmek ya da değiştirmek amacıyla kullanılabildikleri için, bu hücreler fare gelişimindeki çeşitli genlerin rollerini anlamak amacıyla kullanılabildi. Bölüm 3'de tartışıldığı gibi, embriyonik kök hücrelerdeki her hangi bir ilgilenilen gen, klonlanmış bir DNA ile homolog rekombinasyon yoluyla inaktive edilebilir ve bu genin fare gelişimindeki rolü, değiştirilmiş embriyonik kök hücreleri fare embriyosuna naklederek, belirlenebilir.

İki grup araştırmacı 1998 yılında, ilk, insan embriyonik kök hücre hatlarını geliştirdiler. Bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinden dolayı, çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni tedavi yöntemlerinin gelişebileceği umudunu verdiler. Birçok teknik problem ve etik kaygıyı çözmek gerekmesine rağmen, embriyonik kök hücrelerin kullanımını temel alan transplantasyon tedavileri, Parkinson, Alzheimer, diyabet ve omurilik yaralanmaları gibi hastalıkların kesin tedavisi için en büyük umuttur.

hepsinde, tamamen farklılaşmış hücrelerin sayıları, kendi kendilerine çoğalarak değil, kök hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması sayesinde sabit kalır.

Kan hücrelerinin üretimi, farklılaşmış hücre populasyonlarının devamlılığının sağlanmasında kök hücrelerin rolü için iyi bir örnektir. İşlevsel olarak özelleşmiş bir kaç farklı tipte kan hücresi vardır: Eritrositler (kırmızı kan hücreleri) O_2 ve CO_2 taşırlar; granülositler ve makrofajlar fagositik hücrelerdir; plateletler (trombositler) kan pıhtılaşmasında işlev görürler; ve lenfositler immün yanıttan sorumludurlar. Bu hücrelerin hepsinin, bir günden daha az olabileceği gibi birkaç aya kadar olabilen, sınırlı yaşam süreleri vardır ve kemik iliğindeki ortak kök hücrelerin (pluripotent, çok potansiyelli, kök



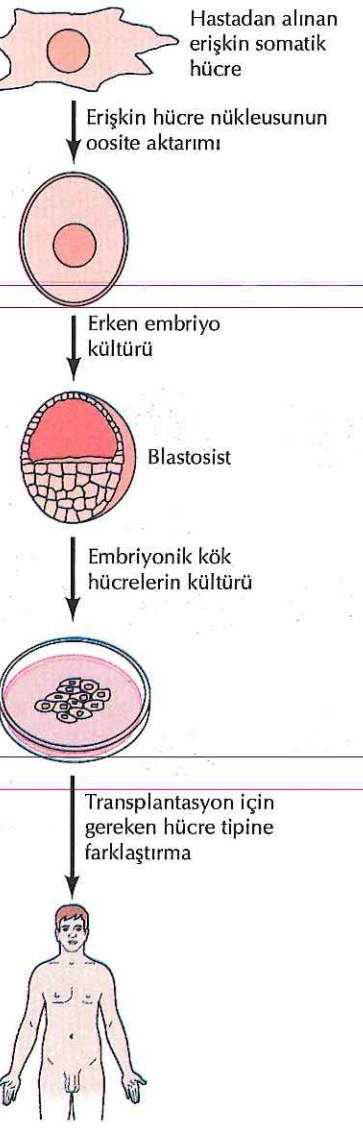
Şekil 14.44 Kan hücrelerinin oluşumu
Kan hücrelerinin tüm farklı tipleri, kemik iliğindeki, çok potansiyelli (pluripotent) kök hücresinden gelişirler. Farklılaşmış hücrelerin öncüleri olgunlaşma sürecinde birkaç tur bölünürler, fakat farklılaşmanın son aşamasında hücre çoğalması durur.

hücre) bölünmesi sayesinde, sürekli olarak üretilirler (Şekil 14.44). Pluripotent kök hücreden oluşan yeni hücreler daha sonra, özel farklılaşma yolaklarına yönelirler. Bu hücreler çoğalmaya ve farklılaşana kadar, birkaç tur bölünmeye devam ederler. Ancak, farklılaşmaları tamamlanınca çoğalmayı durdururlar. Başka bir deyişle, farklılaşmış kan hücre populasyonlarının devamlılığının sağlanması, pluripotent kök hücrelerin sürekli çoğalmasına bağlıdır.

Kök Hücrelerin Tıpta Kullanımı

Kök hücreler, değişik hücre tipleri oluşturmak üzere farklılaştıkları ve çoğalabildikleri için, tıbbi uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahiptirler. Örneğin, çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde ve yaralanmış dokuların onarımında kök hücrelerini kullanmak mümkün olabilir. En geniş farklılaşma kapasitesine sahip kök hücreler, erken embriyo döneminde bulunan ve erişkin organizmadaki tüm farklılaşmış hücre tiplerini verebilen **embriyonik kök hücrelerdir** (**ES hücreleri**). Bölüm 3'de anlatıldığı gibi, bu hücreler, fare embriyosundan alınıp kültürde geliştirilebilir ve farelere değiştirilmiş genleri aktarmak amacıyla kullanılabilirler (bkz. Şekil 3.36). İki grup araştırmacının, 1998 yılında, insan embriyosundan ES hücrelerini

Şekil 14.45 Embriyonik kök hücrelerin sağaltıcı klonlamada potansiyel kullanımı
Sağaltıcı klonlamada, erişkin somatik hücresine ait bir nükleus, kültürde erken embriyo geliştirmek üzere, nükleusu çıkartılmış bir oosite aktarılır. Embriyonik kök hücreler (ES) daha sonra alınır ve transplantasyon tedavisi için kullanılır. ES hücreleri genetik olarak, transplant alıcısının (erişkin nükleusun vericisi) aynısı olduğundan, immün yadsıma söz konusu olmaz.



izole ettiklerini bildirmeleri, insan kök hücrelerinin tıp uygulamalarında kullanılabilme olasılığını yükseltti.

İnsan embriyonik kök hücrenin izolasyonu, 1997 yılında bir erişkin hücre çekirdeğinin bir oosite aktarılması sonrasında, klonlanmış canlı bir hayvan (kuzu) elde edilebileceğinin ilk kez gösterilmesini izlemiştir. Daha sonra, erişkin somatik hücreden elde edilen nükleusun oositlere transferi; kedi, tavşan, keçi, sığır, domuz, fare ve koyunu da içeren çeşitli hayvan türlerinin klonlanmış yavrularını oluşturmak için kullanılmıştır. Embriyonik kök hücrelerin, erişkin çekirdeğinin oositlere transferi ile geliştirilen embriyolardan elde edilebildiğinin görülmesi, bunun **sağaltıcı klonlama** amaçlı kullanılabileceği olasılığını güçlendirdi (Şekil 14.45). Sağaltıcı klonlamada, bir erişkin insan hücre çekirdeği, kültürde bir erken embriyo geliştirmek üzere kullanılabilecek bir oosite aktarılabilecekti. Böyle bir klonlanmış embriyodan elde edilen ES hücreleri, daha sonra, transplantasyon tedavisi için uygun farklılaşmış hücre tiplerini oluşturmak için kullanılabilirdi. Bu şekilde elde edilen farklılaşmış hücrelerin, transplantın alıcısı (ya da başka bir deyişle erişkin somatik hücre çekirdeğini veren kişi) ile genetik olarak aynı olması, immün yadsıma sorunlarını da önleyecektir.

Bu tür transplantasyon sağaltımı olasılığı, omurilik yaralanmaları, diyabet, Alzheimer ve Parkinsonun da içerisinde bulunduğu, birçok yıkıcı hastalığın tedavisi için de ümit verici olmuştur. Hayvan modellerinde bazı başarılı sonuçlar alınmasına karşın, sağaltıcı klonlamanın insanlara uygulanabilmesinden önce, önemli engellerin aşılması gereklidir. Nükleus transferiyle embriyo elde etmek amacıyla kullanılan yöntemlerde belirgin gelişme sağlamaya ve transplantasyon öncesi ES hücrelerini uygun hücre tiplerine farklılaştıracak güvenilir işlemleri geliştirmeye ihtiyaç vardır. Sağaltıcı klonlamanın gelişmesi, sadece insanoğlunun klonlanma (**reprodüktif klonlama**) olasılığı ile ilgili olarak değil, ES hücrelerinin elde edildiği embriyoların kullanılması ile ilgili olarak da etik kaygılar oluşturmaktadır. Doku yenilenmesi için ES hücreleri yerine erişkin dokudan izole edilen kök hücrelerin kullanılabileceği önerilmiş olmasına rağmen, erişkin kök hücrelerin gelişme potansiyeli ve bölünme kapasitesinin ES hücrelerine göre çok sınırlı olduğu bilinmektedir. Konu ile ilgili tartışmalar devam ederken, kök hücre üzerine süren araştırmalar, insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde yeni ufuklar açılacağına olan büyük inancı sürdürmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

mitoz, interfaz, sitokinez, M evresi, G_1 evresi, S evresi, G_2 evresi, G_0, akış sitometresi, floresans ile aktive olan hücre ayırıcı

START, restriksiyon noktası

hücre döngüsü kontrol noktaları, p53

olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF), Cdc2, siklin,

G_1 siklin, Cln, Cdk, Cdk inhibitörü (CKI)

Rb, tümör baskılayıcı gen, E2F

profaz, metafaz, anafaz, telofaz, sentromer, kinetokor, sentrozom, mitotik iğ, prometafaz

kinetokor mikrotübülü, polar mikrotübül, yıldızsı mikrotübül

ÖZET

ÖKARYOT HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre Döngüsü Evreleri: Ökaryot hücre döngüleri dört farklı evreye ayrılır: M, G_1, S ve G_2. M evresi, genellikle, sitokinezin izlediği mitozu kapsar. S evresi DNA replikasyonu sürecidir.

Hücre Döngüsünün, Hücre Büyümesi ve Hücre Dışı Sinyallerle denetlenmesi: Hücre dışı sinyaller ve hücrenin boyutları, hücre döngüsünün özel kontrol noktalarından geçişi düzenler.

Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları: Kontrol noktaları ve 'feedback' kontroller, hücre döngüsünün farklı evrelerinde yer alan olayları koordine eder ve DNA'nın hasarlı olması halinde hücre döngüsünü durdurur.

DNA Replikasyonunu Hücre Döngüsü Başına Bir Kereyle Sınırlamak: DNA replikasyonu bir kez gerçekleşince, hücre mitozu geçene kadar yeni bir S evresinin başlaması engellenir.

HÜCRE DÖNGÜSÜ GELİŞİMİNİN DÜZENLEYİCİLERİ

MPF: *Cdc2 ve Siklin Dimeri*: MPF, tüm ökaryotlarda G_2'den M'ye geçişi düzenleyen anahtar moleküldür. MPF, siklin B ve Cdc2 protein kinazının bir dimeridir.

Siklin ve Siklin-Bağımlı Kinaz Aileleri: Farklı siklin ve Cdc'-benzeri protein kinaz çiftleri, hücre döngüsünün farklı evrelerinin ilerleyişini denetlerler. Cdk ların aktiviteleri siklinlerin ve Cdk inhibitörlerinin bağlanmasıyla düzenlenir.

Büyüme Faktörleri ve D-Tipi Siklinler: Büyüme faktörleri, hayvan hücrelerinin çoğalmasını, D-tipi siklinlerin sentezini uyararak tetikler.

Hücre Döngüsü Gelişiminin İnhibitörleri: DNA hasarı ve çeşitli hücre dışı sinyaller hücre döngüsünün gelişmesini engeller. Bu inhibe edici faktörler, genellikle, Cdk inhibitörlerinin sentezini uyararak çalışırlar.

M EVRESİNDEKİ OLAYLAR

Mitozun Aşamaları: Geleneksel olarak mitoz dört aşamada gerçekleşir: profaz, metafaz, anafaz ve telofaz. Mitozun temel olayları; kromozom yoğunlaşması, mitoz iğinin oluşması, çekirdek kılıfının yıkılması ve iğ mikrotübüllerinin kromozomların kinetokorlarına tutunmasıdır. Sonra, kardeş kromatidler birbirinden ayrılarak iğin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. En sonunda, nükleus yeniden oluşur, kromozomlar yoğunluklarını kaybeder ve sitokinez hücreyi ortadan ikiye ayırır.

MPF ve Mitoza İlerleme: M evresi, nükleer laminler ve kondensinin de içinde bulunduğu diğer protein kinazları fosfatlayacak olan MPF'nin aktiflenmesiyle başlar. MPF aktivasyonu; kromatin yoğunlaşmasından, çekirdek zarfının yıkımından, endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtının fragmanlara ayrılmasından ve mitoz iğini oluşturmak üzere mikrotübüllerin yeniden düzenlenmesinden sorumludur. Daha sonra, iğ mikrotübülleri kardeş kromatidlerin kinetokorlarına bağlanarak, metafaz plağında dizilmelerini sağlar.

MPF'nin Proteolizi ve İnaktivasyonu: Anafaz ve Telofaz: Anafaza-ilerleten kompleks adı verilen bir ubikitin ligazın aktivasyonu, metafazdan anafaza geçişte, çok önemli düzenleme faktörlerinin yıkımına yol açar. Anafaza-ilerleten kompleks tarafından başlatılan ubikitin-aracılıklı proteoliz, anafazın başlangıcında, kohezinin yıkımını sağlayarak kardeş kromatidlerin birbirinden ayrılmasına yol açar. Anafaza-ilerleten faktörün aktivasyonu siklin B'nin yıkımına ve MPF'nin inaktivasyonuna da neden olur ve bunun sonucunda; nükleer zarf yeniden oluşur, kromatin yoğunluğu azalır ve mikrotübüller interfazdaki durumlarına geri döner.

anafaza- ilerleten kompleks, kohezin

Sitokinez: MPF inaktivasyonu sitokinezi de tetikler. Hayvan hücrelerinde, aktin ve miyozinden oluşan bir halkanın daralması sitokinezi sağlar. Yüksek bitkilerin hücrelerinde sitokinez, hücrenin içerisinde yeni bir hücre duvarının ve plazma zarının oluşmasıyla gerçekleşir.

kasılan halka, hücre plakası

MAYOZ VE DÖLLENME

Mayoz Süreci: Mayoz, haploid yavru hücrelerin oluşumunu sağlayan, özelleşmiş bir hücre döngüsüdür. Tek bir tur DNA replikasyonunu peş peşe iki hücre bölünmesi izler. Mayoz I'de, eş kromozomlar önce eşleşir sonra ayrı yavru hücrelere dağılırlar. Mayoz iki ise, kardeş kromatidlerin ayrılmasıyla normal mitoza benzer.

mayoz, leptoten, zigoten, pakiten, diploten, diyakinez, sinaps, sinaptonemal kompleks, kiyazma

Oosit Mayozunun Düzenlenmesi: Omurgalı oositlerinde mayoz, hücre döngüsünde iki noktada kontrol edilir: mayoz I'in diploten aşamasında ve mayoz II'nin metafazında. Metafaz II'deki duraklamanın nedeni, anafaza-ilerleten kompleksin, oositte sentezlenen bir protein kinaz tarafından inhibisyonudur.

kutup cismi, sitostatik faktör (CSF), Mos

Döllenme: Döllenme, anafaza- ilerleten kompleksin Ca^{2+}- bağımlı aktivasyonu yoluyla oosit mayozunun yeniden başlamasını tetikler. Döllenmiş yumurtada başlangıçta var olan iki haploid nükleus yeni diploid genomu oluşturur ve embriyonik hücre bölünmeleri başlar.

döllenme, zigot, pronükleus

KÖK HÜCRELER VE ERİŞKİN DOKULARIN KORUNMASI

Farklılaşmış Hücrelerin Çoğalması: Erişkin hayvanlardaki hücrelerin çoğu, hücre döngüsünün G_0 evresinde tutulmaktadır. Farlılaşmış hücrelerin bazı tipleri çoğalma yeteneklerini kaybetmişlerdir ve kaybolmaları halinde yerine konamazlar. Diğer farklılaşmış hücre tipleri ise, yaralanma ya da hücre ölümü nedeniyle kaybedilen hücreleri yerine koyabilmek için çoğalmaya başlayabilirler.

Kök Hücreler: Farklılaşmış hücrelerin çoğu kendileri çoğalmaz, kök hücrelerin çoğalması ile yenilenir. Kök hücreler bölünerek, biri farklılaşan diğeri kök hücre olarak kalan iki yavru hücre oluştururlar.

kök hücre

Kök Hücrelerin Tıpta Kullanımı: Kök hücreler, çeşitli farklı hücre tipine farklılaşabildikleri ve çoğalabildiklerinden, transplantasyon tedavisi için hücre kaynağı olarak kullanılabilirler. En yüksek farklılaşma ve çoğalma potansiyeline sahip olanlar embriyonik kök hücrelerdir. Somatik hücre nükleusunu oosite aktarma işlemiyle birleştirildiğinde bu hücreler, yıkıcı bir çok hastalıkta transplantasyon tedavisi için sağaltıcı klonlama olasılığı sunar.

embriyonik kök hücre (ES hücre), sağaltıcı klonlama, reprodüktif klonlama

Sorular

1. G_0 ve G_1'deki hücreler hangi yönleriyle benzerdirler? Farklılıkları nelerdir?

2. Her 30 saatte bir bölünen bir memeli hücresi düşünün. Mikroskopik inceleme, her hangi bir zaman diliminde %3.3 hücrenin mitozda olduğunu belirliyor. Akış sitometresiyle elde edilen veriler; %53.3 hücrenin DNA içeriğinin 2n, %16.7 hücrenin DNA içeriğinin 4n ve %30 hücrenin DNA içeriğinin ise 2n ile 4n arasında olduğunu gösteriyor. Bu hücre döngüsünde, G_1, S, G_2 ve M evrelerinin uzunluklarını belirleyiniz.

3. Radyasyon DNA'ya zarar vererek hücre döngüsünü, G_1, S ve G_2 kontrol noktalarında durdurur. Bunun hasarlı hücreler açısından yararı nedir?

4. İğ kontrol noktası, tüm kromozomlar iğin üzerinde uygun şekilde dizilene kadar, anafazın başlamasını geciktirir. Bu kontrol noktasının yetersiz olması ve kromozomlardan biri, sadece tek sentrozomdan gelen mikrotübüllere bağlıyken anafazın başlamasına olanak vermesinin sonucu ne olacaktır?

5. Cdk inhibitörü p16, özgül olarak, Cdk4, 6 / siklin D komplekslerine bağlanır. P16'nın fazla üretilmesinin, hücre döngüsünün ilerleyişi üzerindeki tahmini etkisi ne olacaktır? p16 fazla üretimi, işlevsel Rb proteinine sahip olmayan bir tümör hücresini etkiler mi?

6. Klonlanmış lamin cDNA'ları, MPF tarafından fosfatlanmayan mutantlar oluşturmak üzere, *in vitro* mutasyona uğratıldı. Bu mutant laminlerin ekspresyonu, profaz sonunda nükleer zarfın yıkımını nasıl etkileyecektir?

7. Siklin B bağımlı fosforilasyonu, mitoza girmek için gerekli olan MPF sübstratları hangileridir?

8. Anafaza- ilerleten kompleks tarafından yıkıma dirençli siklin B mutantları üretiliyor. Bu siklin B mutantlarının ekspresyonu, metafazdan anafaza geçişteki olayları nasıl etkileyecektir?

9. Fare *mos* geni, homolog rekombinasyonla inaktive ediliyor. Bunun, oosit mayozu üzerindeki etkisinin ne olmasını beklersiniz?

10. Döllenmiş yumurta, ek spermlerin yumurtaya girişini uzun süre durdurmayı nasıl başarır?

11. Kök hücre nedir?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Ökaryot Hücre Döngüsü

Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15: 2177-2196. [R]

Blow, J. J. and B. Hodgson. 2002. Replication licensing—defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.* 12:72-78. [R]

Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: Preventing an identitv crisis. *Science* 274: 1664-1672. [R]

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. Ann. Rev. Cell Biol.* 7:227-256. [R]

Hartwell, L. H, and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634. [R]

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331. [R]

Lownds, N. F. and J. R. Murgia. 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:17-25. [R]

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441-470. [R]

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Ann. Rev. Genet.* 36: 617-656. [R]

Pardee, A. B. 1989. G_1 events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608. [R]

Paulovich, A. G., D. P Tocyski and L. H. Hartwell. 1997. When checkpoints fail. *Cell* 88:315-321. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 399-402. [R]

Tye, B. K. 1999. MCM proteins in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 649-686. [R]

Vousden, K. H. 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1602:47-59. [R]

Zhou, B.-B. S. and S. J. Elledge. 2000. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439. [R]

Hücre Döngüsü Gelişiminin Düzenleyicileri

Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15: 2177-2196. [R]

Beach, D., B. Durkacz and P. Nurse. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300:706-709. [P]

Dynlacht, B. D. 1997. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 389:149-152, [R]

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396. [P]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267-287. [P]

King, R. W., R. J. Deshaies, J.-M. Peters and M. W. Kirschner. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274: 1652-1659. [R]

Koepp, D. M., J. W. Harper and S. J, Elledge. 1999. How the cyclin became a cyclin: Regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97: 431-434. [R]

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85: 3009-3013. [P]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129-146. [P]

Millband, D. N., L. Campbell and K. G. Hardwick. 2002. The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol.* 12: 205-209. [R]

Morgan, D. O.1997. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81:149-152. [R]

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert. 2002. Toward maintaining the genorne: DNA damage and replication checkpoints. *Ann. Rev. Genet.* 36: 617-656. [R]

Roberts, J. M. 1999. Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98:129-132. [R]

Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem.* Sci. 23:399-402. [R]

Sagata, N. 2002. Untangling checkpoints. *Science* 298:1905-1907. [R]

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 27l: 1672-1677. [R]

Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G_1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512. [R]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232-247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861-870. [P]

Vousden, K. H. 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 47-59. [R]

Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330. [R]

M Evresindeki Olaylar

Earnshaw, W. C. and A. F. Pluta. 1994. Mitosis. *BioEssays* 16: 639-643. [R]

Finger, F. P. and J. G. White. 2002. Fusion and fission: Membrane trafficking in animal cytokinesis. *Cell* 108: 727-730. [R]

Glotzer, M. 2001. Animal cell cytokinesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 351-386. [R]

Hirano, T. 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases tor chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16:399-414. [R]

King, R. W., P. K. Jackson and M. W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571. [R]

McIntosh, J. R., E. L. Grishchuk and R. R. West. 2002. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:193-219. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81:149-152. [R]

Nasmyth, K. 2002. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* 297:559-565. [R]

Peters, J.-M. 2002. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9: 931-943. [R]

Rieder, C. L. and E. D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8: 310-318. [R]

Shorter, J. and G. Warren. 2002. Golgi architecture and inheritance. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 379-420. [R]

Staehelin, L. A. and P. K. Hepler. 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 84: 821-824. [R]

Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky and C. D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell 97:* 99-109.[P]

Mayoz ve Döllenme

Champion, M. D. and R. S. Hawley. 2002. Playing for half the deck: The molecular biology of meiosis. *Nature Cell Biol.* 4: S50-S56.[R]

Evans, J. P. and H. M. Florman. 2002. The state of the union: The cell biology of fertilization. *Nature Cell Biol.* 4: S57-S63. [R]

Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology,* 7th ed, Sunderland, MA: Sinauer Assodates.

Petronczki, M., M. F. Siomos and K. Nasmyth. 2003. Un ménage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440. [R]

Rneder, G. S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Devel.* 11: 2600-2621. [R]

Sagata, N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6: 22-28. [R]

Tunquist, B. J. and J. L. Maller. 2003. Under arrest: Cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17:683-710. [R]

Villeneuve, A. M. and K. J. Hillers. 2001. Whence meiosis? *Cell* 106:647-650. [R]

Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96:175-183. [R]

Kök Hücreler ve Erişkin Dokuların Korunması

Metcalf, D. 1992. Hemopoietic regulators. *Trends Biochem. Sci.* 17: 286-289. [R]

Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances. 1997. Liver regeneration. *Science* 276; 60-66. [Rl

Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88:287-298. [R]

Orkin, S. H. and S. J. Morrison. 2002. Stem-cell competition. *Nature* 418; 25-27. [R]

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins and J. D. Gearhart. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13726-13731. [P]

Thompson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknotz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147. [P]

Wilmut L, N. Beaujean, P. A. de Sousa, A. Dinnyes, T. J. King, L. A. Paterson, D. N. Wells and L. E. Young. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586. [R]

Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813. [P]

Bölüm 15 Kanser

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri 631

Tümör Virusları 640

Onkogenler 644

Tümör Baskılayıcı Genler 657

Moleküler Biyolojinin Kanserden Korunma ve Sağaltım Amacıyla Kullanılması 664

ANAHTAR DENEY: Protoonkogenlerin Keşfi 648

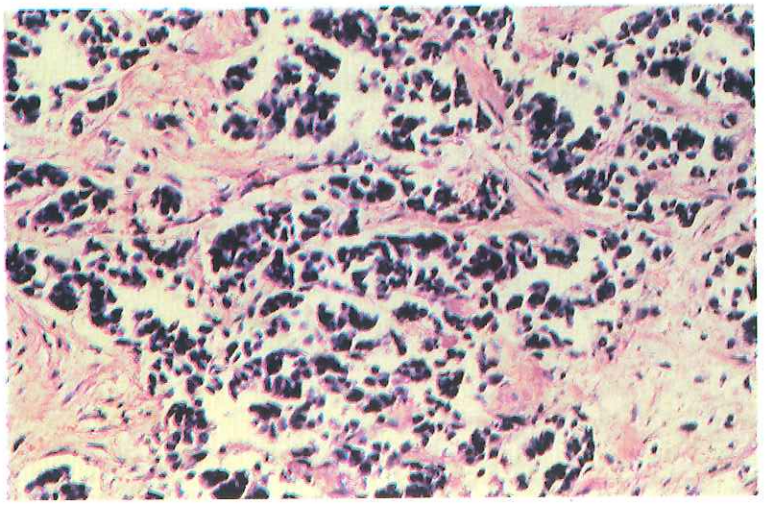
MOLEKÜLER TIP: STI-571: brc/abl Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi 667

KANSER, HÜCRENİN NORMAL DAVRANIŞLARINI DÜZENLEYEN mekanizmaların bozulmasının sonucu olduğundan, kitabın kanser konusuyla sonlanması oldukça uygundur. Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağkalımı önceki bölümlerde belirtildiği gibi organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Kanser hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizma ortadan kalkar, hücreler kontrolsuz biçimde bölünerek çoğalmaya başlar ve sonunda tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevini etkiler.

Kanser hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Moleküler biyologlar ile hücre biyologları bu yüzden kanseri anlayabilmek için yıllarca uğraş vermişler, daha da önemlisi, kanser araştırmaları sayesinde aynı zamanda hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaları da aydınlatmışlardır. Hücrede; sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen proteinlerin birçoğu, ilk kez, hücrenin kontrolsuz çoğalmasına yol açan anormal aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmiştir. Kanser araştırmaları bu yönüyle hücrelerin çalışmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuş, bu mekanizmalar da kanseri anlamamıza yardımcı olmuştur.

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsuz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsuz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılırlar. Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur. Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birçok davranış da bu özelliği yansıtır.



Şekil 15.1 Pankreas kanseri
Kanserli pankreas dokusundan alınan bir kesitin ışık mikroskobunda görünüşü. Koyu mor çekirdekli kanser hücrelerinin normal dokuyu (pembe) istila ettikleri görülüyor. (Astrid ve Hanns-Frieder Michler/SPL/PhotoResearchers, Inc.)

Kanser Türleri

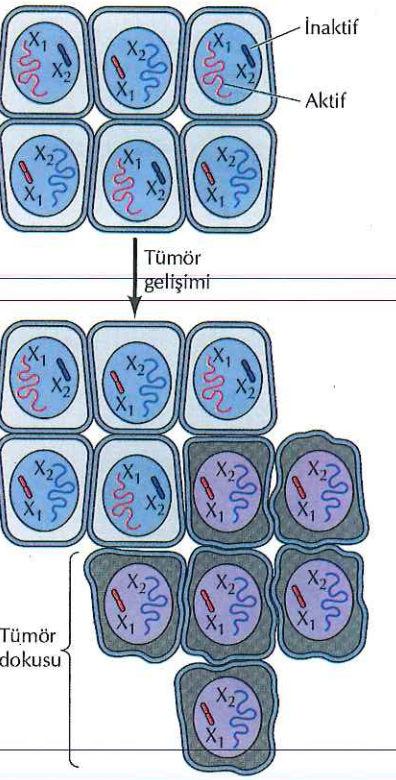
Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu selim ve malin tümörleri birbirinden ayırabilmektir (Şekil 15.1). Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan **tümör** selim ya da malin olabilir. Deride görülen basit siğiller gibi **selim tümörler** çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık **malin tümörler** hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır **(metastaz).** Aslında sadece malin tümörler kanser olarak tanımlanır. Kanseri tehlikeli yapan, bunların yayılma ve metastaz yapma özellikleridir. Selim tümörler genellikle ameliyat ile çıkartılabildiği halde, malin tümörlerin vücudun uzak bölgelerine yayılması hastalığın sınırlı tedavi ile ortadan kaldırılmasını güçleştirir.

Gerek malin, gerekse selim tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanserlerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan **karsinomlar** epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen **sarkomlar,** kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir.

TABLO 15.1 ABD'nde en sık görülen kanser türleri

Organ	Yılda olgu sayısı	Yılda ölüm
Prostat	220,900 (%16.6)	28,900 (%5.2)
Meme	212,600 (%15.9)	40,200 (%7.2)
Akciğer	171,900 (%12.9)	157,200 (%28.2)
Kolon/Rektum	147,500 (%11.1)	57,100 (%10.3)
Lenfoma	61,000 (%4.6)	24,700 (%4.4)
Mesane	57,400 (%4.3)	12,500 (%2.2)
Deri (melanom)	54,200 (%4.1)	7,600 (%1.4)
Rahim	52,300 (%3.9)	10,900 (%2.0)
Böbrek	31,900 (%2.4)	11,900 (%2.1)
Pankreas	30,700 (%2.3)	30,000 (%5.4)
Lösemi	30,600 (%2.3)	21,900 (%3.9)
Yukarıdakilerin toplamı	1,071,000 (%80.3)	402,900 (%72.4)
Tüm organlar	1,334,100 (%100)	556,500 (%100)

Kaynak: Amerikan Kanser Derneği, *Kanser Olguları ve Değerleri*, 2003



Şekil 15.2 Tümörde klonalite
Normal doku, farklı X kromozomlarının (X_1 ve X_2) inaktif olduğu hücrelerden oluşan karışık bir topluluktur. Tümörler değişime uğrayan tek bir hücreden türediğinden tümör hücrelerinin hepsinde daima aynı X kromozomunun inaktif olduğu gözlenir (X_1 inaktif, X_2 aktif).

İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir. Tümörler ayrıca geliştikleri organa (örn., akciğer veya meme kanseri gibi) ve ilgili hücrenin türüne göre de sınıflandırılır. Örneğin, fibrosarkomlar fibroblastlardan, eritrolösemi ise eritrositlerin (alyuvarlar) öncü hücrelerinden kaynaklanır.

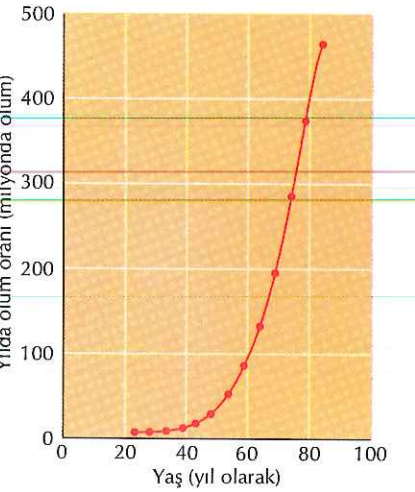
Çok sayıda kanser türü olduğu halde bunların pek azı sık görülür. (Tablo 15.1). Birleşik Devletler'de her yıl bir milyondan fazla yeni kanser vakası görülmekte ve 500,000 den fazla kişi kanser nedeniyle ölmektedir. Toplam kanser olgularının %80'ini vücudun 11 bölgesinde ortaya çıkan kanserler oluşturur. Kanserlerin yarısından fazlasını oluşturan dört kanser türü prostat, meme, akciğer ve barsak/rektum kanserleridir. Şu ana kadar bilinen en ölümcül kanser olan akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin %30'undan sorumludur.

Kanserin Gelişimi

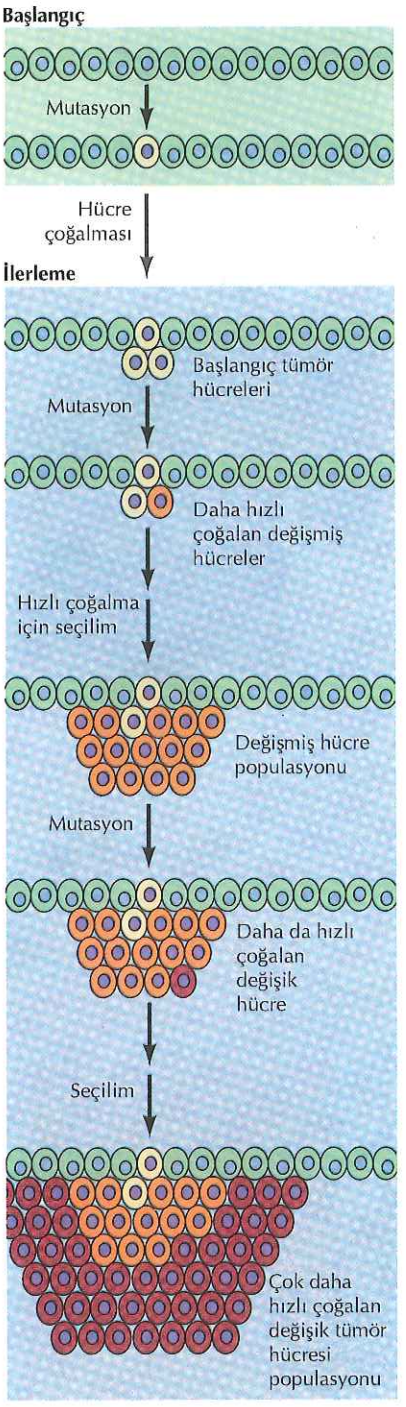
Kanserin temel özelliklerinden biri klonalitedir. Tümörler anormal çoğalmaya başlayan bir tek hücreden gelişir. Birçok tümörün tek hücreden türediği X kromozomu inaktivasyonu analizi ile gösterilmiştir (Şekil 15.2). Bölüm 6'da anlatıldığı gibi dişi hücrelerinde X kromozomlarından biri heterokromatine dönüşerek inaktive olur. X inaktivasyonu, embriyo gelişimi sırasında rastlantısal olarak gerçekleştiğinden, bazı hücrelerde bir kromozom inaktive olurken, bazı hücrelerde de diğer X kromozomu inaktifleşir. Bu yüzden X kromozomundaki genlerden biri için heterozigot olan dişilerde farklı hücrelerde farklı alleller eksprese olur. Normal doku farklı inaktif X kromozomları taşıyan hücrelerin karışımından oluştuğu için, heterozigot dişilerin normal dokusunda iki allelin de ekspresyonu görülür. Buna karşılık tümör dokusunda heterozigot X kromozomu genlerinden sadece bir tanesinin eksprese olduğu gözlenir. Bu, X inaktivasyonunun tümör gelişmeden önce tamamlandığını ve söz konusu tümörü oluşturan hücrelerin hepsinin aynı hücreden türediğini gösterir.

Tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Tam tersine, kanserin gelişmesi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malin şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Kanserin çok aşamalı bir olay olduğunu gösteren özelliklerinden biri, birçok kanser türünün geç yaşlarda ortaya çıkmasıdır. Örneğin, barsak kanserinin görülme sıklığı 30 ile 50 yaşları arasında on kattan fazla artarken, 50 ile 70 yaşları arasında bir on kat daha artar (Şekil 15.3). Kanser görülme sıklığının yaş ile bu kadar dramatik biçimde artması, birçok kanser türünün yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucu olarak geliştiğini düşündürür.

Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar (Şekil 15.4). Bu aşamaların ilki olan **tümör başlangıçı**, bir tek



Şekil 15.3 Barsak kanseri sıklığında yaşa bağlı artış
ABD'nda yılda barsak kanserinden ölüm oranı (Cairns,1978. *Cancer: Science and Society,* New York:W.H.Freeman'dan alınmıştır)



Şekil 15.4 Tümör gelişiminin aşamaları
Kanser mutasyona uğrayan bir tek hücrenin anormal çoğalmasıyla başlar. Yeni mutasyonlar sonucunda giderek daha hızlı çoğalan hücrelerin ortaya çıkmasıyla tümör büyür ve malin özellikler kazanır.

hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişikliğin sonucudur. Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. **Tümör ilerlemesi** bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesiyle devam eder. Bu mutasyonların bir bölümü hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantajlar kazandırır, bu hücrelerden türeyen ve söz konusu avantaja sahip olan yeni hücreler tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın nitelikler kazanırlar. Böylece, gerek çoğalma hızı, gerekse (sağkalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi) daha başka özellikler açısından avantajlı yeni bir tümör hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme klonal seçilim adı verilir. Klonal seçilim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak daha malin özellikler kazanırlar.

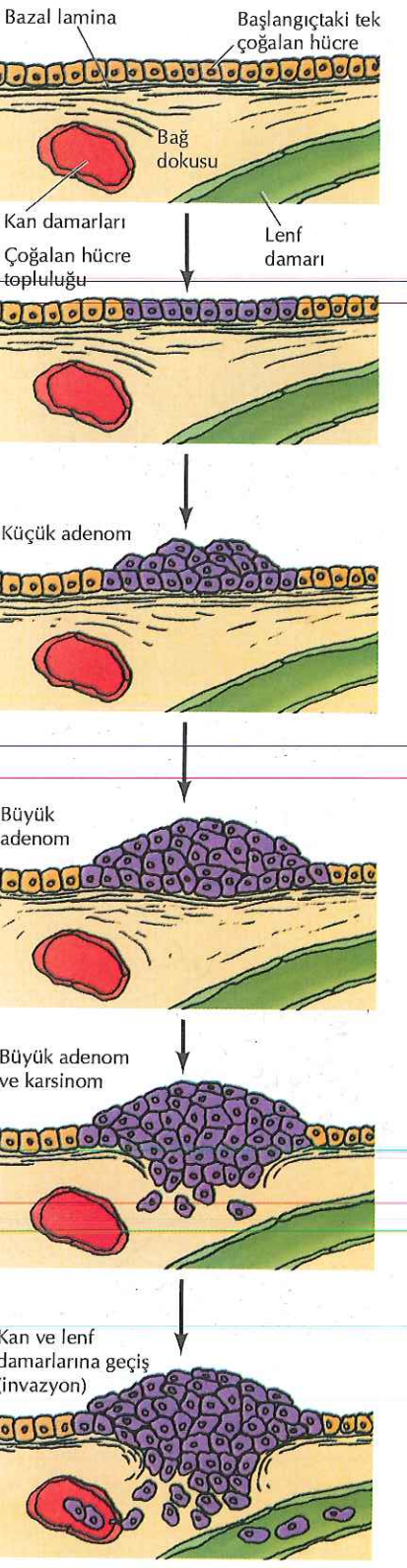
Barsak kanserleri üzerinde yapılan araştırmalar sık görülen bu insan tümörünün gelişmesinde ilerlemenin açık bir örneğini ortaya koymuştur (Şekil 15.5). Tümör gelişiminin en erken aşamasında barsak epitel hücrelerinin çoğalma hızı artar. Daha sonra hızlı çoğalan bu hücrelerden birinde küçük ve selim bir neoplazi (**adenom** veya **polip** gibi) ortaya çıkar. Yeni klonal seçilim döngüleri sonucunda gittikçe daha büyük ve hücre çoğalma hızı daha yüksek yeni adenomlar gelişir. Daha sonra tümör hücrelerinin bazal zarı geçerek altındaki bağ dokusuna ulaşmasıyla, selim adenomlardan malin karsinomlar gelişir. Kanser hücreleri çoğalmayı sürdürür ve barsak duvarını oluşturan bağ dokusu içinde de ilerleyerek sonunda barsak duvarını da aşar ve karın boşluğundaki mesane veya ince barsak gibi diğer organlara yayılırlar. Aynı zamanda kan damarlarına ve lenf yollarına da giren kanser hücreleri, böylece, vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapma olanağını elde ederler.

Kanserin Nedenleri

Kansere yol açan maddelere **karsinojen** denir, ve bunlar gerek deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarla, gerekse insan topluluklarında kanserlerin rastlanma sıklığını irdeleyen (örn., sigara içenlerde akciğer kanserinin sık görülmesi gibi) epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Bu yüzden bir tek maddeyi kanserin nedeni olarak göstermekle olayı çok basite indirgemiş oluruz. Ancak gene de, radyasyon, kimyasallar ve virusların gerek deney hayvanlarında, gerekse insanlarda kansere neden olduğu gösterilmiştir.

Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen (Şekil 15.6) etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyararak gösterirler. İnsanda kanser gelişmesine neden olabilen karsinojenler arasında, mor ötesi ışını (deri kanserinin en önemli nedeni), tütün dumanındaki karsinojenik kimyasallar ve aflatoksin (uygun koşullarda saklanmayan fıstık ve tahılları kontamine eden mantarların oluşturduğu etkin bir karaciğer karsinojeni) sayılabilir. Sigara dumanındaki karsinojenler (benzo*(a)*piren, dimetilnitrozamin ve nikel bileşikleri) insanda kansere yol açtığı bilinen etkenlerin başında gelir. Akciğer kanserlerinin %80-90'ının tartışmasız nedeni olan sigara aynı zamanda ağız boşluğu,

Şekil 15.5 Barsak karsinomunun gelişmesi
Değişime uğrayan bir tek hücre çoğalan bir hücreler topluluğuna dönüşür. Bu hücreler önce gittikçe daha büyük selim adenomlara, daha sonra da malin karsinomlara dönüşür. Kanser hücreleri alttaki bağ dokusunu aşıp kana ve lenf yollarına girerek tüm vücuda yayılır.

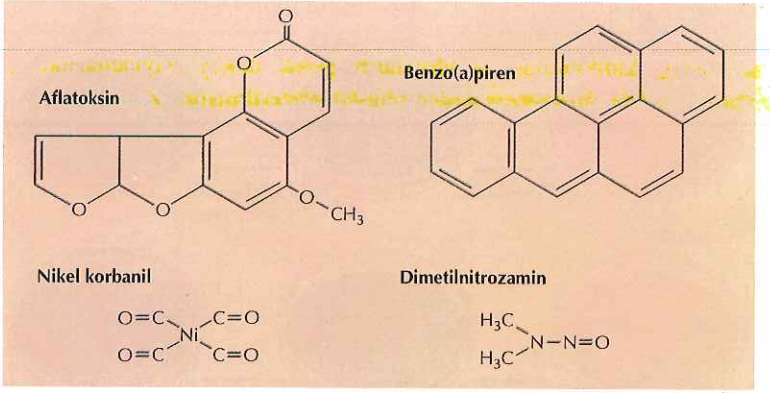


farenks, larinks, özofagus ve daha başka organ kanserlerinde de önemli rol oynar. Sigaranın, tüm kanser ölümlerinin üçte birinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Bu, bir tek karsinojen ajanın ne denli etkili olabildiğini gösteren çarpıcı bir örnektir.

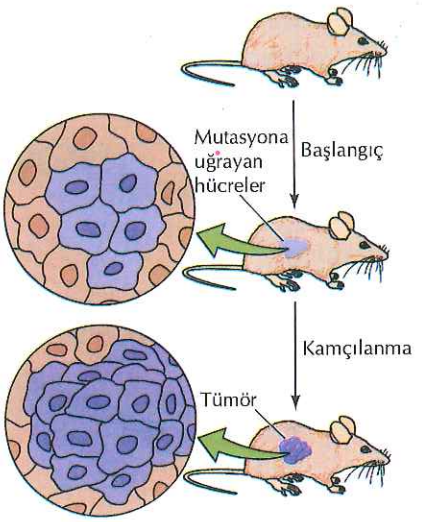
Bazı diğer karsinojenler mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyararak kanser gelişimine zemin hazırlarlar. Tümör gelişiminin erken aşamalarında çoğalma hızı yüksek hücre topluluğunun aşırı büyümesine neden olacak şekilde hücre bölünme hızını artırdıklarından, bu tür maddelere **tümör kamçılayıcılar** denir. Protein kinaz C'yi (bkz. Şekil 13.26) aktifleştirerek hücre çoğalmasını uyaran forbol esterleri bunun tipik örneğidir. Forbol esterlerinin aktivitesi farelerde kimyasal olarak oluşturulan deri tümörleri deneyleri ile gösterilmiştir (Şekil 15.7). Bu sistemde tümörogenez mutajenik bir karsinojenin bir kez uygulanması ile başlatılabilir. Ancak farelere mutasyona uğrayan hücrelerin çoğalmasını uyarmak üzere bir tümör kamçılayıcı (genellikle bir forbol esteri) uygulanmadığı sürece tümör gelişmez.

Başta östrojenler olmak üzere hormonlar da insan kanserlerinin gelişiminde önemli tümör kamçılayıcılardır. Örneğin, östrojen rahimde endometrium hücrelerinin çoğalmasını uyarır. Aşırı östrojen kadında endometrium kanseri gelişme olasılığını artırır. Bu yüzden, menopoz sonrasında uzun süreyle sadece yüksek doz östrojen verilerek uygulanan hormon tedavisi endometrium kanseri riskini büyük ölçüde yükseltir. Östrojenin endometrium hücrelerin çoğalmasını uyarıcı etkisini dengelemek için progesteron verilerek bu risk minimuma indirilir. Buna rağmen östrojen/progesteron kombinasyonları ile uygulanan hormon idame tedavisi meme kanseri riskini artırır.

Kimyasal maddeler ve radyasyona ek olarak bazı viruslar da, gerek deney hayvanlarında, gerekse insanda kansere neden olabilir. Virusların neden olduğu insan kanserlerinin başında, karaciğer ve serviks kanserleri gelir. Bu iki kanser dünyada görülen kanserlerin %10–20'sini oluşturur. Viruslar sadece insanlarda kanser nedeni oldukları için değil, aynı zamanda, ileride anlatılacağı gibi virus araştırmalarının gerek viruslara bağlı, gerekse viruslarle ilgili olmayan kanserlerin gelişminden sorumlu moleküler olayların aydınlatılmasında oynadığı rol açısından büyük önem taşır.



Şekil 15.6 Örnek kimyasal karsinojenlerin yapısı



Şekil 15.7 Fare derisinde tümör oluşturulması
Tümör gelişimine yönelik ilk olay karsinojenlerin neden olduğu mutasyonlardır. Tümörün ortaya çıkması için mutasyon taşıyan hücreleri çoğalmaya uyaran tümör kamçılayıcıların etkisi gereklidir.

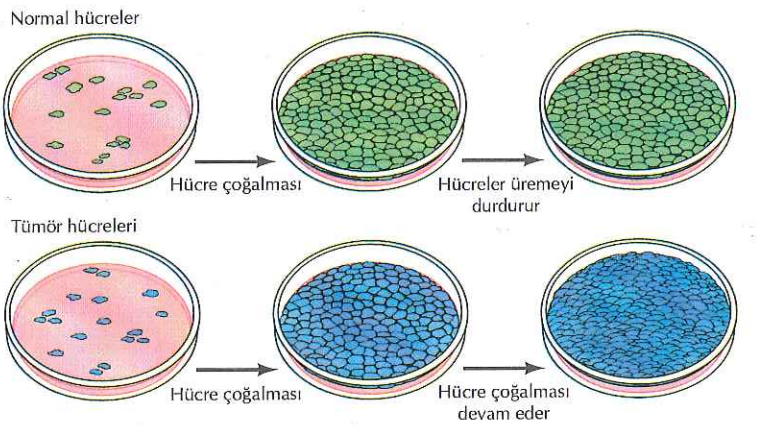
Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücresinin kontrolsuz çoğalması, daha önceki bölümlerde anlatılan ve hücrenin çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değişikliklerin birikmesinin sonucudur. Kanser hücresinde ortaya çıkan ve onu normal eşdeğerinden ayıran bazı hücre davranış özellikleri de bu ilişkiyi yansıtır. Kanser hücrelerinde hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Bütün bunlar bir araya geldiğinde, kanser hücresinin bu karakteristik özellikleri malinitenin hücresel düzeyde tanımlanmasını sağlar.

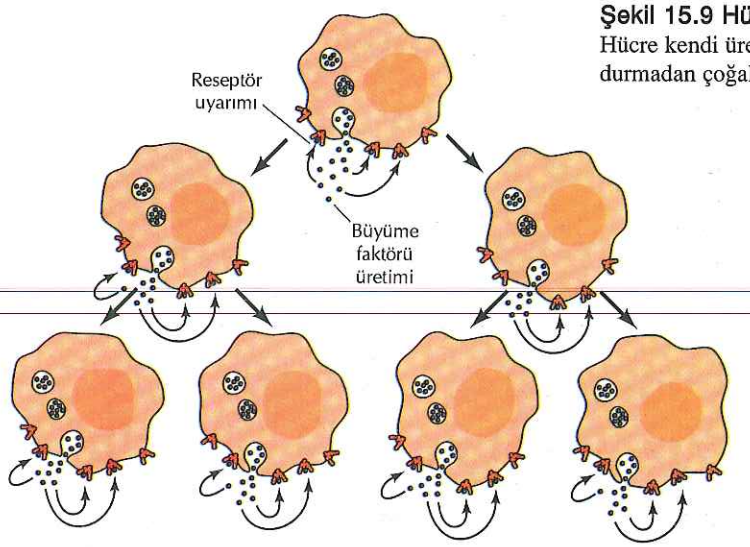
Kanser hücreleri, hücre kültüründe de, kontrolsüz *in vivo* çoğalma sırasında sergiledikleri davranışları taklit ederler. Kültür ortamında kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki ilk fark, normal hücrelerin çoğalmasının, yoğunluğa-bağlı inhibisyondan etkilenmesidir (Şekil 15.8). Normal hücreler kültür ortamında (genellikle ortama eklenen serumun içinde) bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak, belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar. Bu yoğunluğa ulaştıkları zaman çoğalmayı keserek sessiz faza geçer ve hücre döngüsünun G_0 evresinde dururlar (bkz. Şekil 14.6). Buna karşılık kanser hücrelerinin çoğalması yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenmez. Normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyarak G_0 da durmak yerine, kontrolsüz *in vivo* çoğalma davranışlarını sürdürerek, yoğunluğun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler.

Normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki bir başka fark da, kanser hücrelerinin hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duymasıdır. Bölüm 13'de anlatıldığı gibi, birçok hücrenin çoğalması, en azından kısmen, polipeptit büyüme faktörleri tarafından denetlenir. Bazı hücre tiplerinde ve özellikle fibroblastlarda, kültürde çoğalabilmenin temel koşulu serum büyüme faktörlerinin varlığıdır. Bu hücrelerin büyüme faktörüne duydukları gereksinim, yoğunluğa bağlı inhibisyon kavramı ile yakından ilgilidir. Zira normal fibroblastların çoğalmaya son verdikleri yoğunluk, kültür ortamındaki serum büyüme faktörlerinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Birçok tümör hücresinin büyüme faktörlerine bağımlılığı normal eşdeğerlerine kıyasla daha az olduğundan, bu özellik tümör



Şekil 15.8 Yoğunluğa bağlı inhibisyon
Normal hücreler kültürde belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalır ve bu yoğunluğa ulaştıklarında çoğalma durur. Buna karşılık tümör hücreleri yoğunluktan etkilenmeden çoğalmayı sürdürürler.

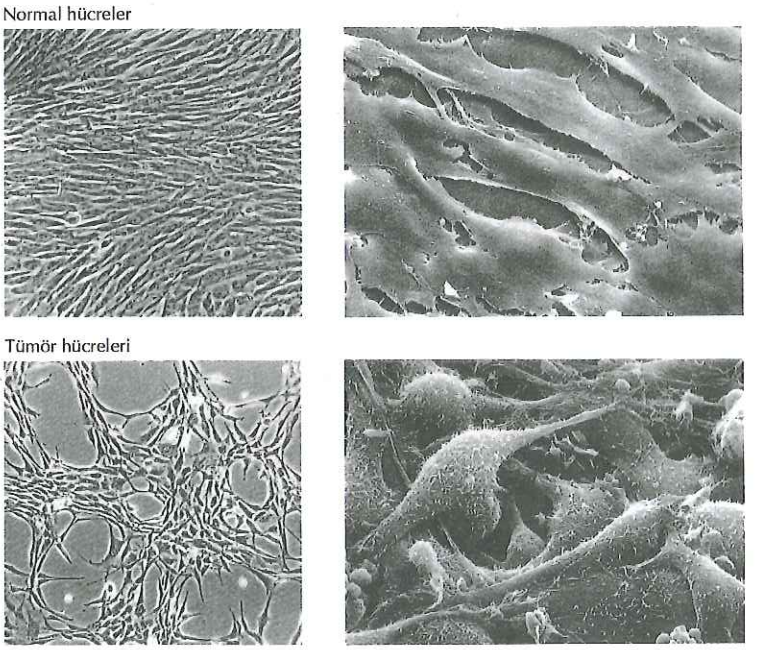


Şekil 15.9 Hücre çoğalmasının otokrin uyarımı
Hücre kendi ürettiği büyüme faktörü tarafından uyarılarak durmadan çoğalır.

hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalmasını sağlar. Bazı durumlarda kanser hücreleri çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilir (Şekil 15.9). Hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörünün bu şekilde, kendisi tarafından salgılanması hücreyi sürekli olarak çoğalmaya uyarır (**otokrin çoğalma uyarımı**). Bu yüzden kanser hücreleri diğer normal, fizyolojik kaynaklardan gelen büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması, bazı durumlarda hücre içi sinyal sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden, örneğin, Bölüm 13'de anlatılan ve hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin ya da (Ras proteinleri veya protein kinazlar gibi) başka proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanır.

Kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi de daha düzensizdir. Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Örneğin, karsinomların (epitelyal kanserler) gelişiminde epitel hücrelerindeki başlıca adezyon molekülü olan E-kaderinin ortadan kalkması büyük önem taşır. Adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma sonucunda, kanser hücreleri diğer hücreler ve doku bileşenleri ile etkileşimine bağlı kısıtlamalardan kurtulur, bu da kanser hücresinin yayılma ve metastaz yapma yeteneğini artırır. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneğinin azalması, morfolojik ve hücre iskeletinde değişikliklerine de yol açar: Tümör hücrelerinin çoğu hücredışı matrise veya komşu hücrelere tutunamadıkları için normal hücrelerden daha yuvarlaktır.

Hücre-hücre etkileşimleri açısından normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki en çarpıcı fark **kontakt inhibisyon** kavramında görülür (Şekil 15.10). Normal fibroblastlar kültür kabı üzerinde komşu hücrelerden biri ile temas edinceye kadar ilerler, başka bir hücreyle temas kurdukları anda hareketlerine son verirler. Bu durumda, hücrenin daha fazla hareket etmesi engellenir ve normal hücreler birbirlerine tutunarak kültür kabı yüzeyinde düzenli olarak sıralanırlar. Buna karşılık tümör hücreleri, komşu hücrelerle temas ettikten sonra da hareket etmeyi sürdürür, yanlarındaki hücrenin üzerine çıkar ve



Şekil 15.10 Kontakt inhibisyon
Normal fibroblastlar ile tümör hücrelerinin ışık mikroskobunda (solda) ve tarama elektron mikroskobunda (sağda) görünüşü. Normal fibroblastlar başka hücreler ile temas ettiklerinde ilerlemeye son vererek kültür kabının yüzeyinde yanyana, düzgün bir yapı oluştururlar. Tümör hücreleri ise kontakt inhibisyondan etkilenmeden birbirlerinin üzerine çıkarak, çok katlı, düzensiz yapılar oluşturur. (Lan Bo Chen, Dana Farber Cancer Institute)

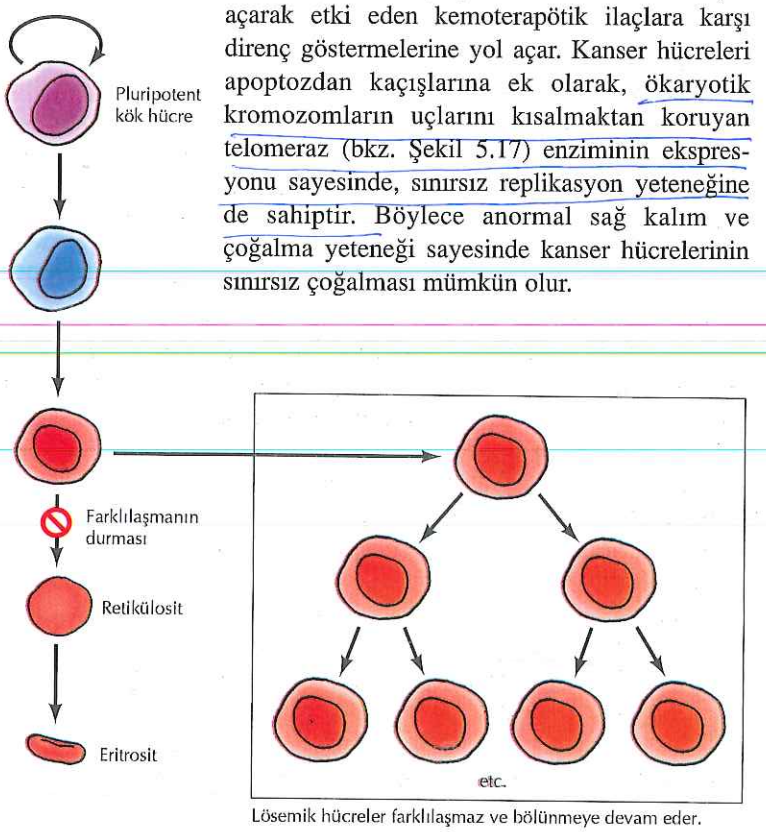
düzensiz, çok katlı kümeler oluştururlar. Normal hücreler hücre-hücre teması sonucunda sadece hareket etmeye değil, çoğalmaya da son verirken, kanser hücreleri çoğalmayı inhibe eden bu temasa duyarsızdır.

Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu yüzden invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki özelliği daha vardır. Bunlardan birincisi malin hücrelerin hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal komşu dokunun içine girmesine olanak veren proteazlar salgılamasıdır. Örneğin, hücrelerden salgılanan kollajenaz, karsinomların bazal laminayı parçalayıp aşarak altındaki bağ dokusuna girebilmesi açısından önem taşır (bkz. Şekil 15.5). İkincisi, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu **(anjiyogenez)** hızlandıran büyüme faktörleri salgılarlar. Hücre sayısı bir milyonu aştığında, hücrelere oksijen ve besin maddelerinin ulaşması ve tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni damarlar oluşması gereklidir. Bu damarlar tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre doku kapillerlerinin duvarlarındaki endotel hücrelerini çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar ve sonuçta tümörün içine doğru uzanan yeni kapillerler oluşur. Yeni damarların oluşumu sadece tümörün büyümesi açısından değil, aynı zamanda metastaz açısından da önemlidir. Tümör hücreleri anjiyogenik uyarı sonucunda gelişen yeni kılcallara kolayca girebildiğinden, bu olay kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastatik yayılımın başlamasına olanak sağlar.

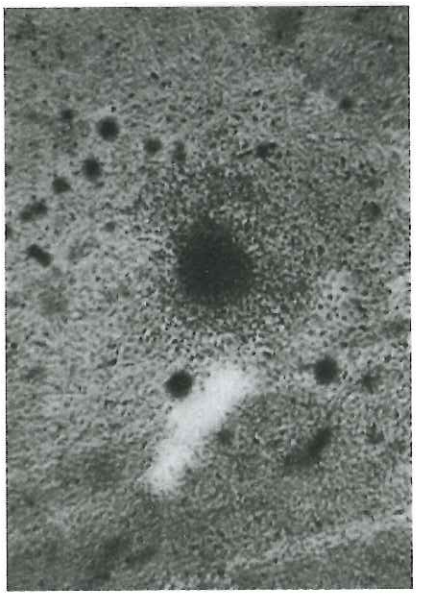
Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği de normal biçimde farklılaşmamalarıdır. Bu farklılaşma kusuru anormal çoğalma ile yakından ilişkilidir, çünkü Bölüm 14'de de anlatıldığı gibi birçok hücre tam olarak farklılaştıktan sonra artık çoğalmaz. Kanser hücreleri normal farklılaşma programını izlemek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar.

Farklılaşma kurusu ile malinite arasındaki ilişkinin en güzel örneklerinden biri lösemilerdir. Kandaki farklı hücrelerin tümü, kemik iliğindeki ortak bir kök hücreden türer (bkz. Şekil 14.44). Bu hücrelerden köken alan hücreler belirli farklılaşma yolaklarını izlerler. Örneğin, bazı hücreler eritrositleri oluşturacak şekilde farklılaşırken başka hücreler de, lenfosit, granülosit ve makrofajları oluşturur. Bütün bu hücreler farklılaşırken defalarca bölündükleri halde, farklılaştıkları zaman hücre bölünmesi de durur. Buna karşılık lösemi hücreleri farklılaşmak yerine, olgunlaşmanın erken aşamalarından birindeki durumlarını koruyarak, bölünme ve çoğalma yeteneklerini sürdürürler (Şekil 15.11).

Bölüm 13'de anlatıldığı gibi, **apoptoz** ya da **programlı hücre ölümü,** kan hücreleri de dahil, birçok hücre türünde farklılaşmanın temel ögelerindendir. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi, tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır. Örneğin, birçok normal hücrenin sağ kalması büyüme faktörlerinden ya da hücre dışı matristen gelen apoptozu engelleyen sinyallere bağlıdır. Tümör hücreleri ise normal hücrelerin gereksinim duyduğu faktörlerin yokluğunda bile kolayca sağ kalabilir. Normal çevresel sinyaller ortadan kalktığında tümör hücrelerinin apoptoza girmemesi, sadece primer tümörün gelişmesi açısından değil, metastatik hücrelerin vücudun başka bölgelerinde canlılıklarını korumaları ve çoğalmaları açısından da önemlidir. DNA hasarı gerçekleştiğinde normal hücreler apoptoza girdikleri halde kanser hücreleri bunu yapmaz. Kanser hücrelerinin apoptoza gidememesi, radyasyona ve DNA hasarına yol açarak etki eden kemoterapötik ilaçlara karşı direnç göstermelerine yol açar. Kanser hücreleri apoptozdan kaçışlarına ek olarak, ökaryotik kromozomların uçlarını kısalmaktan koruyan telomeraz (bkz. Şekil 5.17) enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir. Böylece anormal sağ kalım ve çoğalma yeteneği sayesinde kanser hücrelerinin sınırsız çoğalması mümkün olur.



Şekil 15.11 Farklılaşma hatası ve lösemi
Değişik kan hücreleri kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerden gelişir. Farklılaşmış hücreleri oluşturan öncü hücreler olgunlaşırken defalarca bölünür ama farklılaşmanın son aşamasında hücre bölünmesi sona erer. Lösemi hücrelerinde hücrenin sürekli çoğalmasına paralel olarak hücre farklılaşması, olgunlaşmanın erken aşamasında durur.



Şekil 15.12 Fokus testi
Rous sarkoma virusu ile transforme edilen tavuk embryo fibroblastlarının oluşturduğu bir odak (H.M.Temin ve H Rubin, 1958. *Virology* 6:669'dan alınmıştır)

Hücrelerin Kültürde Transformasyonu

Radyasyon, kimyasallar veya virusların etkisiyle tümör uyarımının çalışılabilmesi için, bir karsinojenik maddenin etkisinin tekrarlanabilir şekilde izlenmesi ve miktarının belirlenmesine olanak sağlayan deney sistemlerine gerek vardır. Karsinojenlerin etkisi hayvanlar üzerinde incelenebildiği halde bu deneylerin denetlenmesi ve kantitatif ölçümler yapılması güçtür. Bu yüzden normal hücrenin, kültürde tümör hücresine dönüşmesini (yani **hücre transformasyonu** işlemini) saptamaya olanak sağlayan *in vitro* test sistemlerinin geliştirilmesi kanser araştırmalarında önemli bir ilerleme olmuştur. Bu testler, normal hücrelerin kültür ortamında karsinojenik bir maddenin etkisine maruz bırakılmasıyla ortaya çıkan ve tümör hücrelerinin karakteristik *in vitro* çoğalma özelliklerini sergileyen, transforme olmuş hücreleri saptamak amacıyla planlanır. Bu hücrelerin kullanılması, yalnızca hayvanlarda yapılabilen deneylerle elde edilemeyecek hücre transformasyonu analizlerinin yapılmasına olanak sağlamıştır.

İlk ve en yaygın olarak kullanılan transformasyon testi, 1958 yılında Howard Temin ile Harry Rubin tarafından geliştirilen odak testidir. Odak testi, transforme olan hücrelerin, kültür kabının yüzeyindeki normal hücrelerin üzerinde morfolojik açıdan farklı, belirgin odaklar oluşturması esasına dayanır (Şekil 15.12). Odak testinde transforme hücrelerin üç değişik özelliğinden yararlanılır: morfolojik değişiklikler, kontakt inhibisyonun kaybı ve yoğunluğa bağlı çoğalma inhibisyonunun ortadan kalkması. Sonuç, kültür plağındaki normal hücrelerin üzerinde çoğalan, morfolojik olarak değişikliğe uğramış hücrelerden oluşan bir koloni oluşumudur. Bu şekilde ortaya çıkan transforme hücre odakları, karsinojenik madde uygulandıktan bir iki hafta sonra saptanabilir *in vitro* ortamda transforme edilen bu hücreler duyarlı hayvanlara verildiğinde tümör oluşturabilirler. Bu da *in vitro* transformasyonun kanser hücrelerinin oluşumunu gösteren geçerli bir belirteç olduğunu destekler.

Tümör Virusları

Hayvan virus ailelerinde yer alan ve **tümör virusu** adı verilen birçok virus deney hayvanlarında veya insanda doğrudan tümör oluşturabilir (Tablo 15.2). İnsanda kanser oluşturan viruslar Hepatit B ve C virusları (karaciğer kanseri), papilloma virusları (serviks kanseri ve diğer anogenital kanserler), Epstein-Barr virusu (Burkitt lenfoması ve nazofarenks karsinomu), Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virus (Kaposi sarkomu) ve insan T-hücre lenfotropik virusudur (erişkin T

TABLO 15.2 Tümör Virusları

Virus ailesi	İnsan tümörü	Genom boyutu (kb)
DNA Genomu		
Hepatit B virusu	Karaciğer kanseri	3
SV40 ve polyomavirus	Yok	5
Papillomavirusu	Serviks kanseri	8
Adenoviruslar	Yok	35
Herpesviruslar	Burkitt lenfoması, Nazofarenks karsinomu, Kaposi Sarkomu	100-200
RNA Genomu		
Hepatit C virusu	Karaciğer kanseri	10
Retroviruslar	Erişkin T hücreli lösemi	9-10

hücreli lösemi). Ek olarak, HIV virusu da AIDS'li hastalarda immün yetmezlik sonucunda gelişen kanserlerden dolaylı olarak sorumludur.

Daha önce de belirtildiği gibi tümör virusları, yalnız insanlarda hastalığa neden oldukları için değil, hücresel ve moleküler transformasyonun araştırılmasında model olarak da, kritik rol oynamıştır. Genomlarının küçük olması, tümör virusları üzerinde yapılan moleküler araştırmaları kolaylaştırmıştır. Böylece, kansere neden olan viral genler tanımlanabilmiş ve kanseri moleküler düzeyde anlamamıza yardım eden bugünkü bilgiler elde edilmiştir.

Hepatit B ve C Virusları

Tüm hayvan DNA virusları içinde en küçük (yaklaşık 3 kb) genoma sahip olan **hepatit B virusları,** ördek, dağ sıçanı, sincap, kuş ve insanlar da dahil olmak üzere, birçok canlı türünde karaciğer hücrelerini enfekte eder. Hepatit B enfeksiyonu genellikle akut karaciğer hasarı ile sonuçlanır. Enfekte olan canlıların %5–10 kadarında akut enfeksiyon kendiliğinden sona ermez ve kronik karaciğer enfeksiyonuna dönüşür. Bu tür kronik enfeksiyon sonucunda karaciğer kanseri riski yüz kattan daha fazla artar. Asya ile Afrika'nın belirli bölgelerinde çok görülen Hepatit B enfeksiyonu, her yıl bu bölgelerde ortaya çıkan bir milyon kadar (dünyadaki toplam kanser olgularının yaklaşık %10'u) kanser vakasından sorumludur.

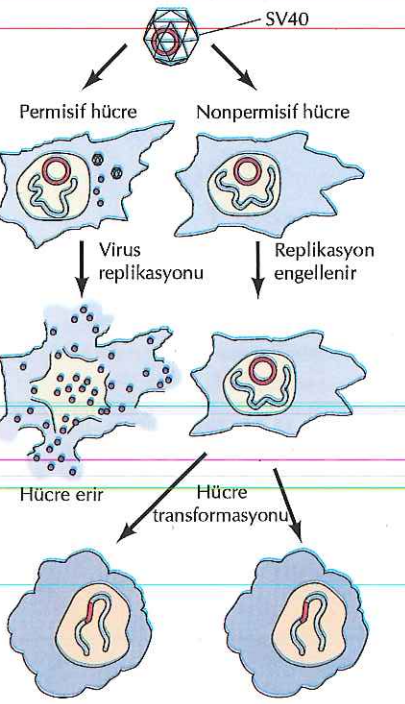
Hücre transformasyonundan Hepatit B virusunun viral bir geni (X geni) sorumludur. X geni hücrede anormal çoğalmayı ve ölümsüzlüğü sağlayan birçok genin ekspresyonunu uyarır. Hepatit B virusunun etkisiyle ortaya çıkan kronik doku hasarı ve yangı nedeniyle hücrelerin sürekli çoğalması, kanserin gelişimine zemin hazırlar. **Hepatit C virusu** ise yaklaşık 10 kb lık bir RNA virusudur. Bu virus da Hepatit B virusu gibi, kanser riskini artıran kronik karaciğer enfeksiyonlarına neden olur. Kronik enfeksiyon sonucunda ortaya çıkan hücre çoğalması kanser gelişmesinin en önemli nedenidir. Bazı hepatit C virus proteinleri, enfekte karaciğer hücrelerini doğrudan çoğalmaya da uyarabilirler.

SV40 ve Polyoma Virusu

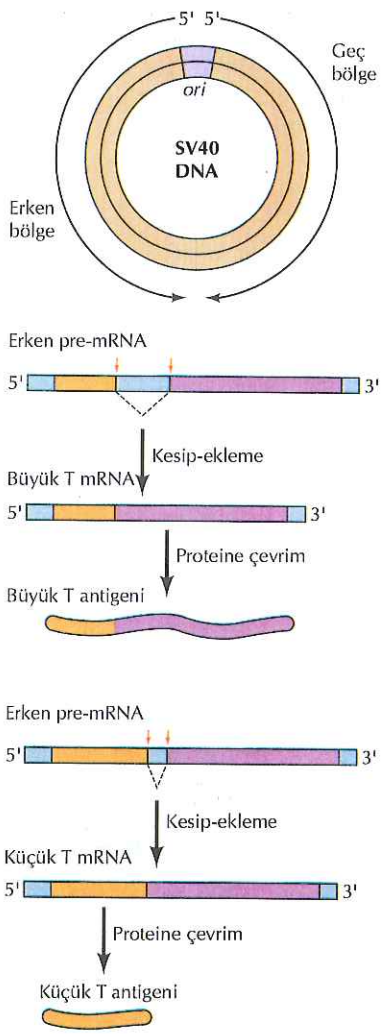
Simian virus 40 (SV40) ve polyoma virusu insan kanserleri ile ilişkili olmadıkları halde, hücre transformasyonunun moleküler temelinin anlaşılmasına model olması açısından büyük önem taşırlar. Genomlarının küçük (yaklaşık 5 kb) olması ve gerek virus replikasyonu, gerekse transformasyon için uygun hücre kültür testlerinin varlığı, bu virusların kanser araştırmalarında başarıyla kullanılmasını sağlamıştır.

SV40 ve polyoma virusları doğal konak organizmalarının (sırasıyla maymun ve fare) hücrelerinde tümör oluşumunu veya transformasyonu uyarmazlar. Doğal konaklarının hücrelerinde (virusun çoğalmasına olanak veren "permisif" hücreler), enfeksiyon, virus replikasyonu sonucunda hücrenin parçalanması ve yeni virus partiküllerinin çevreye yayılması ile sonuçlanır (Şekil 15.13). Virusun içinde çoğalabildiği bir hücre, virus replikasyonu sonucunda öldüğünden, transforme hale geçemez. Virusun transformasyon potansiyeli, virus replikasyonunun bloklanmış olduğu, virusun çoğalmasına izin vermeyen (nonpermisif) hücreleri enfekte ettiğinde ortaya çıkar. Bu durumda, viral genom bazen hücre DNA'sının içine yerleşir ve belirli virus genlerinin ekspresyonu enfekte hücrenin transformasyonuna yol açar.

SV40 ile polyoma virusun, transformasyona neden olan genleri ayrıntılı moleküler analizlerle saptanmıştır. Viral genomların ve



Şekil 15.13 SV40'ın replikasyonu ve transformasyon
Virusun içinde çoğaldığı hücre sonunda parçalanır ve yeni virus partikülleri çevreye yayılır. Virusun çoğalmasına izin vermeyen hücrelerde virus replikasyonu durur ve bazı hücreler kalıcı biçimde transforme olurlar.



Şekil 15.14 SV40'ın genomu
Genom, erken ve geç bölgelere ayrılır. Büyük ve küçük T antijenleri erken bölgeye özgü pre-mRNAnın farklı işlenmesiyle ortaya çıkar.

mRNA'ların dizileri tamamen belirlenmiş, transformasyona yol açmayan mutant viruslar izole edilmiş ve gen aktarım testleri ile her bir virus geninin transformasyon yeteneği ayrı ayrı araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonunda, bu viruslar ile transformasyonun, litik enfeksiyonun erken aşamasında eksprese olan aynı viral genlerin ekspresyonundan kaynaklandığı anlaşılmıştır. SV40 ile polyoma viruslarının genomu erken ve geç bölgelere ayrılır. Erken bölge enfeksiyondan hemen sonra eksprese olur ve viral DNA sentezi için gereklidir. Geç bölge ise viral DNA replikasyonu başlayana kadar eksprese olmaz ve virus partikülünün yapısal bileşenlerini kodlayan genleri içerir. SV40'ın erken bölgesi küçük ve büyük T antijeni adı verilen 17 kd ve 94 kd luk iki protein kodlar (Şekil 15.14). Bu iki proteini kodlayan mRNA'lar erken bölgeye özgü aynı transkriptin değişik biçimde kesilip eklenmesi ile oluşur. Polyoma virus da benzer küçük ve büyük T antijenlerine ek olarak, orta T adı verilen 55 kd luk bir başka erken bölge proteini daha kodlar. Hücrelerin erken bölge proteinlerini kodlayan cDNA'lar ile transfeksiyonu, SV40 büyük T antijeninin, transformasyonu indüklemek için yeterli olduğunu göstermiştir. Buna karşılık polyomavirusun transformasyon etkisinden öncelikle orta T sorumludur.

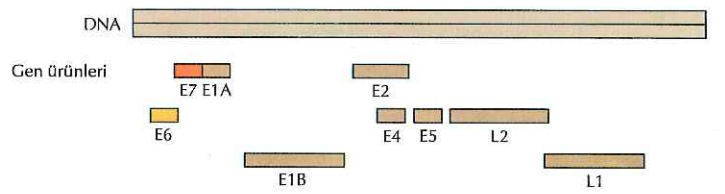
Litik enfeksiyon sırasında, erken bölge proteinleri virus replikasyonu için gerekli çoklu işlevler yaparlar. Örneğin, SV40 büyük T antijeni SV40 orijinine bağlanır ve viral DNA replikasyonunu başlatır (bkz. Bölüm 5). Buna ek olarak, her iki virusun erken bölge proteinleri de konak hücrede gen ekspresyonunu ve DNA sentezini uyarırlar. Virus replikasyonu konak hücrenin enzimlerine (örn., DNA polimeraz) bağımlı olduğundan, konak hücrenin bu gibi uyarıları virusun yaşam döngüsü açısından kritik olaylardır. Hayvan hücrelerinin çoğu çoğalmadığından, viral DNA replikasyonu için gerekli olan enzimlerin sentezlenebilmesi için, bu hücrelerin bölünmeye uyarılması gereklidir. Erken genlerin ürünleri tarafından gerçekleştirilen bu hücre proliferasyonu uyarısı, eğer viral DNA, bir nonpermisif (virusun çoğalmasına izin vermeyen) hücre genomuna kalıcı bir şekilde yerleşmiş ve eksprese olmuşsa, transformasyona yol açabilir.

Bu bölümde daha sonra tartışılacağı gibi, hem SV40 hem de polyoma virusun erken bölge proteinleri, hücre çoğalmasını düzenleyen konak hücre proteinleri ile etkileşerek trasnformasyona yol açarlar. Örneğin, SV40 büyük T antijeni konak hücrede hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen en önemli tümör baskılayıcı proteinler olan Rb ile p53'e bağlanarak bu proteinlerin işlevini engeller.

Papillomaviruslar

Papillomaviruslar insanda ve birçok değişik canlı türünde selim ve malin tümörler oluşturan, küçük (genomları yaklaşık 8kb) DNA viruslarıdır. İnsan papillomaviruslarının değişik dokularda epitel hücrelerini enfekte eden, yaklaşık 60 kadar farklı tipi tanımlanmıştır. Bunların bazıları sadece siğil gibi selim tümörler oluştururken, bazıları da, başta serviks ve anogenital kanserler olmak üzere malin karsinomlara neden olurlar. ABD'nde sürüntü alma (Pap smear) testinin sağladığı erken tanı ve kesin tedavi olanağı sayesinde serviks kanserinden ölüm oranı göreceli olarak düşüktür. Buna karşılık dünyanın başka bölgelerinde serviks kanseri oldukça sık görülür ve dünyadaki tüm kanserlerin %5-10'unu oluşturur.

Papillomaviruslar ile hücre transformasyonu, iki erken bölge geni olan *E6* ve *E7* nin ekspresyonu sonucunda oluşur (Şekil 15.15). E6 ve E7 proteinleri de SV40 büyük T antijeni, gibi konak hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını denetleyen Rb ve p53 gibi proteinler ile



Şekil 15.15 İnsan papillomavirus genomu
Gen ürünleri E (erken) ve L (geç) olarak adlandırılır. Transformasyon E6 ile E7 nin etkisiyle gerçekleşir.

etkileşerek transformasyonu uyarırlar. Özellikle, E7 Rb'ye bağlanır, E6 ise p53'ün ubikütin aracılığıyla yıkımını uyarır.

Adenoviruslar

Adenoviruslar genom boyutu 35kb dolayında olan, geniş bir DNA virus ailesidir. Papillomavirusların aksine, adenoviruslar doğal insan ve diğer hayvan kanserleri ile ilişkili değildir. Bununla birlikte, adenoviruslar üzerinde geniş araştırmalar yapılmıştır ve deneysel kanser biyolojisi açısından önemli bir model sistem oluşturmuşlardır

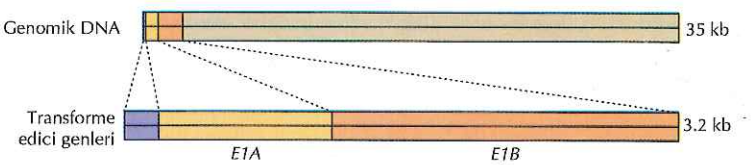
SV40 ve polyomaviruslar gibi adenoviruslar da, doğal konaklarının hücrelerinde litik enfeksiyona neden olurken, çoğalmalarına izin vermeyen konaklarda transformasyonu uyarabilirler. Adenoviruslarla transformasyon, virusun doğal konak hücrede replikasyonu için gerekli olan iki erken bölge geninin (E1A veE1B) ekspresyonundan kaynaklanır (Şekil 15.16). E1A Rb'ye, E1B ise p53'e bağlanarak tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitesini engellerler. Bu yüzden, SV40, papillomaviruslar ve adenovirusların hepsi, başta Rb ile p53'ün işlevini bozarak ve benzer sinyal yollarını etkileyerek transformasyona neden olurlar.

Herpesviruslar

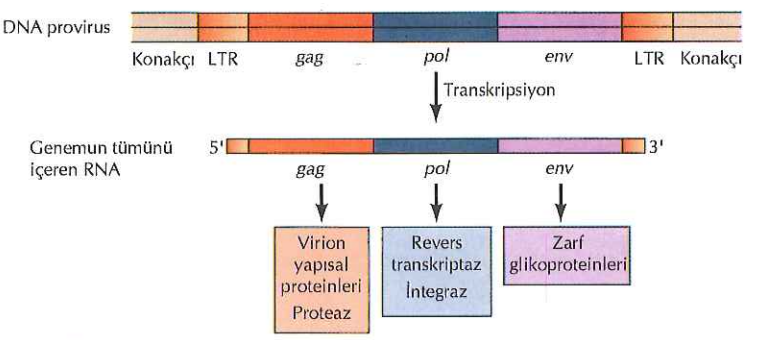
Genomları 100–200 kb arasında değişen **herpesviruslar** en karmaşık virus türlerindendir. Bazı herpesviruslar kurbağa, tavuk ve maymun gibi hayvanlarda tümör oluşturabilirler. Ayrıca herpesvirus ailesinin iki üyesi, **Kaposi sarkomu- ilişkili herpesvirus** ve **Epstein-Barr** virusu insan kanserleri ile de ilişkilidir. Kaposi sarkomu- ilişkili harpesvirus, Kaposi sarkomunun gelişimi açısından kritik rol oynarken, Epstein-Barr virusu de Afrika'nın bazı bölgelerinde Burkitt lenfoması, AIDS'li veya immün sistemi baskılanmış bireylerde B-hücreli lenfoma ve Çin'de nazofarenks karsinomu gibi insan tümörüyle ilişkilidir.

Epstein-Barr virusu belirtilen insan tümörleri ile ilişkisi yanında, hücre kültüründe de insan B lenfositlerini transforme edebilir. Buna karşılık, biraz da genomunun karmaşıklığı nedeniyle, Epstein-Barr virusunun replikasyon mekanizması ve transformasyona neden olma şekli tam olarak bilinmemektedir. Lenfositlerin transformasyonu için birçok viral genin etkisi gereklidir. Epstein-Barr virusunun transformasyona neden olan proteinlerinden birinin (LMP1) B hücrelerini çoğalmaya uyaran bir zar proteini gibi davrandığı gösterilmiş, ancak diğer proteinlerin işlevi henüz aydınlanmamıştır.

Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirus DNA'sı, Kaposi sarkomu hücrelerinde bulunur ve bu tümörlerde hücre çoğalmasını ve sağ kalımını etkileyen çok sayıda viral gen de eksprese olur. Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirusun transformasyona neden olan bir proteininin, SV40 T antijeni gibi Rb ve p53 ile etkileştiği gösterilmiştir.



Şekil 15.16 Adenovirus genomu
Transformasyondan erken bölge genleri E1*A* ve E1*B* sorumludur.



Şekil 15.17 Tipik bir retrovirus genomu
Hücre DNA'sına yerleşen provirus DNA'sının transkripsiyonu sonucunda, tüm genoma eşlenik bir RNA molekülü oluşur. Bu molekül yeni virus partikülleri için genomik RNA, *gag* ve *pol* genleri için ise mRNA görevi yapar. Uzun RNA molekülü kesilip-eklenerek, *env* geni için mRNA molekülü oluşturur. *gag* geni viral proteazı ve virus partikülünün yapısal proteinlerini, *pol*, revers transkriptaz ile integrazı, *env* ise zarf proteinlerini kodlar.

a host cell (ev sahibi hücre) ↓ Retrovirus inside the host cell cytoplasm (obligate parasite) ↓ reverse transkriptaz enzimi yardımıyla ev sahibi hücrenin sitoplazmasında RNA → DNA sentezi ↓ Bu DNA ev sahibi hücre DNA'sına integrate olur. (katılır, birleşir)

Retroviruslar

Retroviruslar, insan dahil, birçok canlıda tümör oluşturabilir. Bir retrovirus olan insan T-hücre lenfotropik virusu tip I (HTLV-I), Japonya, Karayibler ve Afrika'da sık görülen erişkin T-hücreli lösemisine neden olur. T lenfositlerinin HTLV-I etkisiyle transformasyonundan, hücrenin çoğalmasını denetleyen çok sayıda genin ekspresyonunu etkileyen bir protein kodlayan, viral *tax* geni sorumludur. AIDS'e de bir başka retrovirus (HIV) neden olur. HTLV-I'in aksine HIV, normal hücreyi doğrudan kanser hücresine dönüştürerek kansere neden olmaz. Ancak, AIDS'li hastalarda, özellikle lenfoma ve Kaposi sarkomu başta olmak üzere, bazı kanser türlerinin sıklığı yüksektir. Bağışıklık sistemi baskılanmış diğer bireylerde de sık görülen bu kanserler, başka virus enfeksiyonlarına bağlıdır (Epstein-Barr virusu veya Kaposi sarkomu- ilişkili herpesvirus gibi) ve AIDS'li hastalarda immün sistemdeki yetersizliğin sonucu olarak ortaya çıkarlar.

Retrovirusların onkojenik potansiyelleri cinslerine göre çok farklılık gösterir. Retrovirusların çoğunda, virusun replikasyonu için gerekli olan ama transformasyonda rol oynamayan üç gen (*gag*, *pol* ve *env*) bulunur (Şekil 15.17). Bu tür retroviruslar çok ender durumlarda ve ancak hücresel genlerin içine veya hemen yanına provirus DNA sının yerleşmesi ile ortaya çıkan mutasyonlar sonucunda kansere neden olurlar.

Bazı retroviruslarda ise, hücre transformasyonuna yol açan ve etkin biçimde kanser oluşturan belirli genler bulunur. Yüksek düzeyde onkojenik bu retrovirusların en tipik örneği, ilk kez Peyton Rous tarafından 1911 yılında bir tavuk sarkomundan elde edilen **Rous sarkom virusudur (RSV).** RSV ile yapılan araştırmalar, bu virusun izole edilmesinin üzerinden 50 yılı aşkın süre geçtikten sonra, tümör gelişiminin moleküler düzeyde birçok yönüyle anlaşılması açısından model oluşturan ilk viral onkogenin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır.

Onkogenler

Kanser, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Tümör virusları ile yapılan araştırmalar, belirli genlerin (**onkogen** adı verilen) hücreleri transforme edebildiklerini göstererek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Buna rağmen insan kanserlerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık %80'i) virusların etkisiyle değil, radyasyon ya da kimyasal karsinojenez gibi başka nedenlerle ortaya çıkar. Bu yüzden, viral onkogenler ile yapılan araştırmaların önemli bir yönü de, viruslara

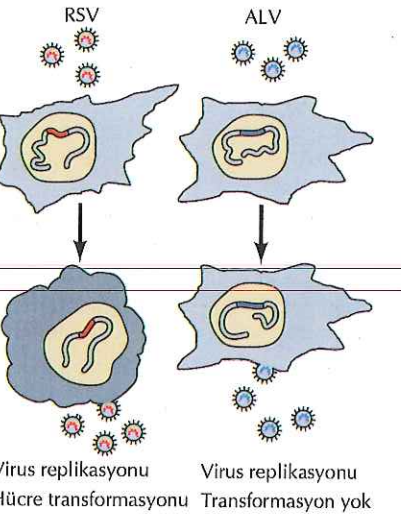
bağlı olmayan kanserlerin oluşumunda rol oynayan hücresel onkogenlerin, bu çalışmalarla belirlenmiş olmasıdır. Viral ve hücresel onkogenler arasındaki temel ilişki, onkojenik retroviruslar üzerinde yapılan araştırmalar sayesinde tanımlanmıştır.

Retroviral Onkogenler

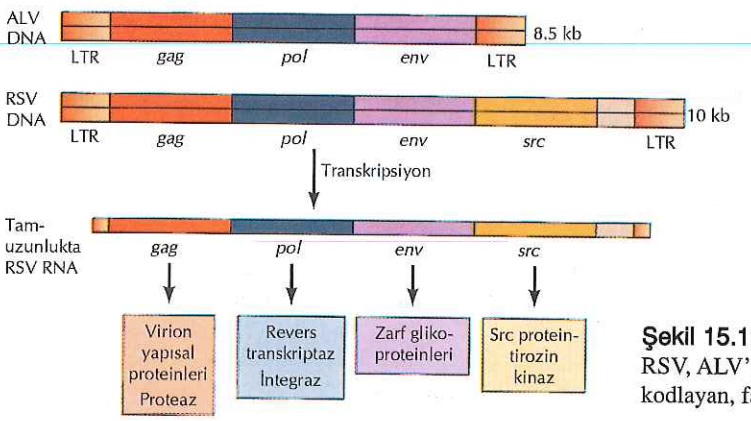
Viral onkogenler ilk olarak, hücre kültüründe tavuk embryo fibroblastlarını transforme eden ve tavuklara verildiğinde 1-2 hafta içinde büyük sarkomlar oluşturan RSV'da tanımlanmıştır (Şekil 15.18). Buna karşılık, RSV ile yakından ilişkili tavuk lösemi virusu (ALV), aynı hücrelerde transformasyona neden olmadan çoğalabilir. İki virusun transformasyon yeteneği arasındaki bu fark, RSV'nin enfekte hücrelerin transformasyonundan sorumlu genetik materyal içerdiğine işaret etmiş, RSV ile ALV'nin genomlarının kıyaslanması bu hipotezi doğrulamıştır: RSV'nin genomu 10 kb, ALV'nin genomu ise yaklaşık 8.5 kb kadardır.

Peter Vogt ile Steven Martin 1970'li yılların başlarında, RSV'nin transformasyona yol açmayan, delesyona uğramış ya da sıcaklığa duyarlı mutantlarını izole etmişlerdir. Bu mutant virusların enfekte ettikleri hücrelerde normal biçimde çoğalabilmeleri, RSVnin replikasyon için gerekli olmayan ve doğrudan transformasyondan sorumlu genetik bilgileri içerdiğini göstermiştir. Yapılan analizler hem delesyon görülen, hem de sıcaklığa duyarlı mutant virusların etkisiyle, kanatlılarda tümör oluşumundan, kültürde ise fibroblastların transformasyonundan bir tek genin sorumlu olduğunu göstermiştir. RSV sarkomlara neden olduğu için, bu gene *src* adı verilmiştir. *src* geni RSV'nin genomuna fazladan eklenmiştir, ALV'de ise bulunmaz (Şekil 15.19). Bu genin kodladığı 60kd luk protein, tanımlanan ilk protein tirozin kinazdır (Bölüm 13'deki Anahtar Deneye bakınız).

Tavuk, hindi, fare, sıçan, kedi ve maymun gibi birçok değişik canlıdan 40 dan fazla farklı ve etkili onkojenik retrovirus izole edilmiştir. Bunların hepsi RSV gibi, virusun replikasyonu için gerekli olmayan ve transformasyona neden olan en az bir (bazıları iki) onkogen içerir. Bazı durumlarda değişik retroviruslar aynı onkogeni içerebilir, fakat bu virus grubundan iki düzineden fazla farklı onkogen izole edilmiştir (Tablo 15.3). *src* için olduğu gibi, bu onkogenlerin (***ras*** ya da ***raf*** gibi) kodladıkları proteinler de hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarının temel bileşenleridir (bkz. Şekil 13.32).



Şekil 15.18 RSV ve ALV ile hücre transformasyonu
Gerek RSV, gerekse ALV tavuk embryo fibroblastlarını enfekte ederek çoğalabilir, ancak, sadece RSV bu hücrelerde transformasyona neden olur.



Şekil 15.19 RVS genomu
RSV, ALV'de bulunmayan ve Src protein-tirozin kinazı kodlayan, fazladan bir gene, *src*, sahiptir.

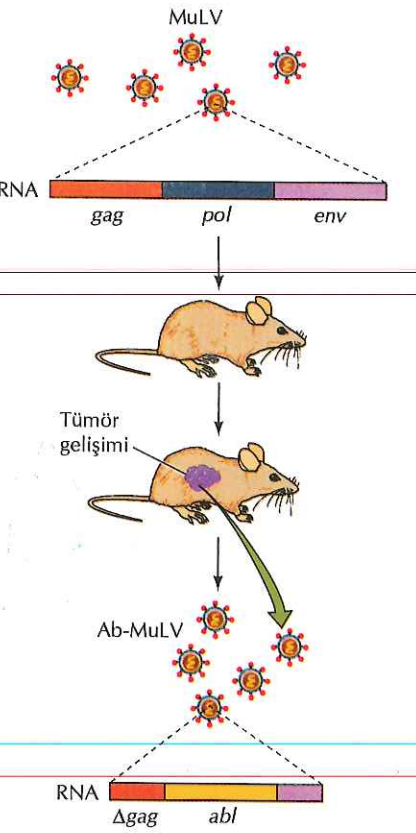
TABLO 15.3 Retroviral Onkogenler

Onkogen	Virus	Tür
abl	Abelson lösemi	Fare
akt	AKT8	Fare
cbl	Cas NS-1	Fare
crk	CT10 sarkom	Tavuk
erbA	Avian eritroblastozis-ES4	Tavuk
erbB	Avian eritroblastozis-ES4	Tavuk
ets	Avian eritroblastozis-E26	Tavuk
fes	Gardner-Arnstein felin sarkom	Kedi
fgr	Gardner-Rasheed felin sarkom	Kedi
fms	McDonough felin sarkom	Kedi
fos	FBJ mürin osteojenik sarkom	Fare
fps	Fujinami sarkom	Tavuk
jun	Avian sarkom-17	Tavuk
kit	Hardy-Zuckerman felin sarkom	Kedi
maf	Avian sarkom AS42	Tavuk
mos	Moloney sarkom	Fare
mpl	Miyeloproliferatif lösemi	Fare
myb	Avian miyeloblastozis	Tavuk
myc	Avian miyelositomatozis	Tavuk
p3k	Avian sarkom-16	Tavuk
qin	Avian sarkom-31	Tavuk
raf	3611 mürin sarkom	Fare
rasH	Harvey sarkom	Sıçan
rasK	Kirsten sarkom	Sıçan
rel	Retiküloendoteliozis	Hindi
ros	UR2 sarkom	Tavuk
sea	Avian eritroblastozis-S13	Tavuk
sis	Simian sarkom	Maymun
ski	Avian SK	Tavuk
src	Rous sarkom	Tavuk
yes	Y73 sarkom	Tavuk

Protoonkogenler

Retroviral onkogenlerin beklenmedik bir özelliği, virus replikasyonu ile ilgili olmayışlarıdır. Bütün viruslar en etkin biçimde çoğalmak üzere programlandıklarından, viral onkogenlerin virusun yaşam çevrimi için gerekli olmaması çelişkili bir durumdur. Bu yüzden bilim adamları retroviral onkogenlerin nereden geldiğini ve virus genomuna nasıl yerleştiğini araştırmış ve bunun sonunda insan kanserlerinde hücresel onkogenler tanımlanmıştır.

Onkogenlerin kökeni hakkındaki ilk ipucu, yüksek derecede onkojenik virusların izolasyon şeklinden elde edilmiştir. Abelson lösemi virusu bunun tipik örneğidir (Şekil 15.20). Yüz elliden fazla fareye, sadece replikasyon için gerekli *gag*, *pol* ve *env* genlerine sahip olan ve transformasyona neden olmayan bir virus verildiğinde, bu farelerden birinde lenfoma ortaya çıkmış ve bu lenfomadan, yeni ve değişik bir onkogen (*abl*) içeren, onkojenik yeni bir retrovirus (Abelson lösemi virusu) izole edilmiştir. Bu olay retroviral onkogenlerin konak hücrenin genlerinden geldiğini ve ender de olsa, bazı durumlarda konak hücre genlerinin virus-konak rekombinasyonu



Şekil 15.20 Abelson lösemi virusunun izolasyonu
Yüksek onkojeniteye sahip Ab-MuLV, transformasyona neden olmayan bir virus (Moloney murin lösemi virusu, MuLV) verilen bir farede gelişen ender bir tümörden izole edilmiştir. MuLV'de sadece replikasyon için gerekli olan *gag*, *pol* ve *env* genleri bulunur. Buna karşılık Ab-MuLV'de transformasyondan sorumlu olan yeni bir gen daha (*abl*) yer alır. Ab-MuLV genomunda *abl* geni virusun replikasyondan sorumlu genlerinden bazılarının yerine geçerek, eksik gag geninin (*Δgag*) bir bölümü ile birleşmiştir.

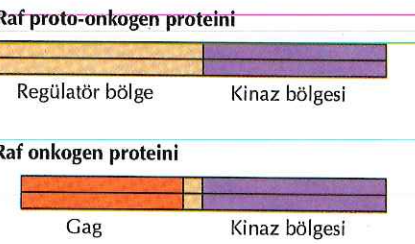
sonucunda virus genomuna yerleşerek yeni, yüksek onkojenitede bir virus oluşturduğu hipotezini desteklemiştir.

Bu hipotezdeki kritik öngörü, normal hücrelerin de retroviral onkogenler ile yakından ilişkili, bunlara benzeyen genler içermesidir. Bu varsayım, 1976 yılında Harold Varmus, Michael Bishop ve arkadaşları tarafından, RSV *src* onkogenine özgü bir probun normal civciv hücrelerinde bulunan benzer diziler ile etkileştiğinin gösterilmesiyle kesin olarak doğrulanmıştır. *src* ile ilişkili dizilerin (insan dahil) birçok başka omurgalının genlerinde de bulunması, bu dizilerin evrim boyunca korunduğunu göstermektedir. Başka onkojenik viruslara özgü problarla yapılan deneylerin de benzer sonuçlar vermesiyle, retroviral onkogenlerin, normal hücrelerin genlerinde yer alan benzer dizilerden türediği kesinlik kazanmıştır.

Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere **protoonkogen** adı verilir. Bunlar (*src*, *ras* ve *raf* gibi), hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Onkogenler ise, bu protoonkogenlerin anormal eksprese olan veya mutant şekilleridir. Bu genlerde gerçekleşen değişiklikler sonucunda, onkogenler anormal hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine yol açarlar.

Bir retroviral genoma yerleşen onkogen, birçok yönüyle hücresel protoonkogenden farklıdır. Öncelikle, viral onkogenin transkripsiyonu protoonkogenin transkripsiyonunu düzenleyen normal diziler yerine, viral promotör ve güçlendirici dizilerin etkisiyle gerçekleşir. Bu yüzden onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda ve bazen de, olmaması gereken hücrelerde eksprese olurlar. Bazı durumlarda gen ekspresyonundaki bu anormallikler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi tranformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir.

Gen ekspresyonundaki bu gibi değişikliklere ek olarak onkogenler, normal hücresel proteinlere kıyasla yapısal ve işlevsel açıdan farklılıklar gösteren proteinler kodlarlar. Birçok onkogen (örn., *raf*) amino ucunda viral diziler taşıyan bir birleşik proteinin sentezine neden olur (Şekil 15.21). Bu tür birleşik proteinlerinin oluşmasına yol açan rekombinasyon olayları çoğunlukla, protoonkogenlerin viruslara geçişi sırasında gerçekleşir ve bu işlem sırasında protoonkogenin hem amino, hem de karboksil ucu sıklıkla delesyona uğrar. Bu delesyonlar, protoonkogenin aktivitesini düzenleyen düzenleyici bölgelerin kaybına, dolayısıyla, aktivitesi kontrol edilemeyen onkogen proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir. Örneğin, viral *raf* onkogeninin kodladığı birleşik proteinde, normal raf proteininin amino ucundaki diziler delesyon sonucu ortadan kalkmıştır. Proteinin amino ucundaki bu diziler, proteinin kinaz aktivitesinin düzenlenmesi açısından önemli olduğundan, delesyon onkogen tarafından kodlanan Raf proteininin kontrolsüz, sürekli aktivite göstermesine yol açar. Denetlenemeyen Raf akitivitesi, hücre çoğalmasını uyararak transformasyona neden olur.



Şekil 15.21 Raf onkogen proteini
Raf onkogen proteini, amino ucunda bulunan düzenleyici bölge ile karboksi ucundaki protein kinaz bölgelerinden oluşur. Viral Raf proteininde düzenleyici bölge ortadan kalkar ve yerini viral kökenli Gag dizilerine bırakır. Sonuçta Raf kinaz bölgesi sürekli aktif durumda kalarak, hücre transformasyonunu başlatır.

ANAHTAR DENEY

Protoonkogenlerin Keşfi

DNA Related to the Transforming Gene(s) of Avian Sarcoma Viruses Is Present in Normal Avian DNA

Dominique Stehelin, Harold E. Varmus, J. Michael Bishop and Peter K. Vogt

Department of Microbiology, University of California, San Francisco (DS, HEV, and JMB) and Department of Microbiology, University of California, Los Angeles (PKV)

Nature, Volume 260, 1976, pages 170-173

Bağlam

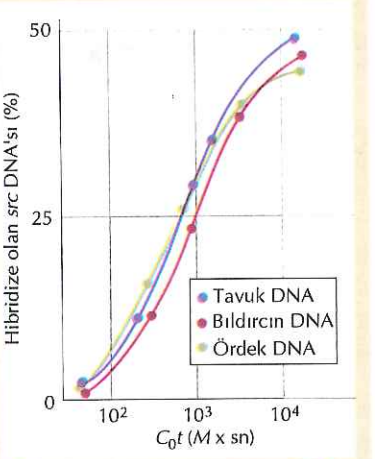
RSV'nun genetik incelenmesi, virusun replikasyonu için gerekli olmayan, özgül olarak hücre transformasyonundan sorumlu bir gen olan, ilk viral onkogeni (*src*) tanımladı. Enfekte hayvanların tümörlerinden çıkan yüksek onkojenite kazanmış retroviruslar, retroviral onkogenlerin, konakçı hücrenin bağlantılı genlerinden türediği şeklindeki hipotezin öne sürülmesini sağlamıştır. Bu öneriyle uyumlu olarak, çeşitli türlerin normal hücrelerinin, nükleik asit hibridizasyon testleriyle belirlenebilen, retrovirus-benzeri DNA dizilerine sahip oldukları bulundu. Ancak, bu dizilerin, retroviral onkogenlere mi, yoksa virus replikasyonunda görevli genlere mi ait olduğu anlaşılamamıştı.

Harold Varmus, J. Michael Bishop ve arkadaşları, *src* onkogeninin genetik özelliklerini ortaya çıkararak bu önemli konuyu çözümlediler. Öncelikle, Peter Vogt, *src* geninin tamamını ya da önemli bir kısmını kapsayan, yaklaşık 1.5kb delesyona sahip, transformasyon yapamayan RSV mutantlarını daha önceden izole etmişti. Stehelin ve çalışma arkadaşları, özel olarak *src* dizilerini simgeleyen bir cDNA prob üretmek için bu mutantlardan yararlandılar. Belirlenen bu probların, nükleik asit hibridizasyon deneylerinde kullanılması, normal hücrelerin src-benzeri DNA dizileri içerdiklerinin kesinlik kazanmasını sağladı.

Deneyler

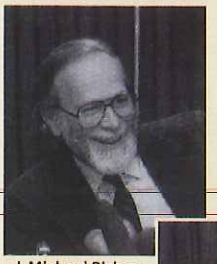
İlk revers transkriptaz, RSV genomik RNA'sının tamamına komplemanter, kısa tek iplikli DNA fragmanlarından oluşan radyoaktif bir cDNA probu hazırlamak amacıyla kullanıldı. Bu prob daha sonra, transformasyon yapamayan delesyon mutantından elde edilen fazla miktarda RNA ile hibridleştirildi. Viral replikasyon genlerine komplementer cDNA fragmanları, transformasyon yapamayan RSV RNA'sına bağlanarak RNA-DNA ikili sarmalı oluşturdu. Buna karşın, *src* genine komplementer olan cDNA fragmanları hibridize olmayıp, tek iplikli formlarını korudular. Daha sonra, src onkogen dizilerine özgül prob sağlamak üzere, bu tek iplikli DNA alındı. Transformasyon yapamayan RSV mutantlarındaki delesyon boyutundan anlaşılabileceği gibi, *src*-özgül prob RSV RNA'sında 1.5kb lık bir bölgeye homologdu.

Radyoaktif *src* cDNA'sı daha sonra, normal avian hücrelerinde benzer DNA dizisinin belirlenmesi amacıyla, hibridizasyon probu olarak kullanıldı. Çarpıcı şekilde, src cDNA'sı, normal tavuk DNA'sının yanı sıra diğer avian türlerine de büyük oranda hibridize oldu (şekli inceleyiniz). Böylece, bu deneyler, normal hücrelerde *src* onkogenine önemli derecede benzeyen



src-özgül cDNA'nın, normal tavuk, bıldırcın ve ördek DNA'larına hibridizasyonu.

Diğer, birçok onkogen, ilişkili hücresel protoonkogenden, onkogen ürününde tek bir amino asit değişikliğine yol açan bir nokta mutasyonu ile ayrılır. Bazı durumlarda bu tür amino asit değişiklikleri (daha önce anlatılan delesyonlar gibi), onkogen proteinlerinin denetimsiz aktivite göstermesine neden olur. Bir sonraki bölümde insan kanserlerindeki rolü anlatılan *ras* onkogeni, bu tür nokta mutasyonlarına önemli bir örnektir.



J. Michael Bishop

Harold Varmus

DNA dizileri bulunduğunu göstererek, retroviral onkogenlerin viral genoma katılan hücre genlerinden köken aldığı şeklindeki hipotezi destekledi.

Etki

Stehelin ve arkadaşları 1976'da yayınlanan makalelerini, hücresel *src* dizilerinin "hücre çoğalması ve gelişiminde veya hücre davranışlarının fiziksel, kimyasal ya da viral etkenlerle transformasyonunda görevli olabilecekleri" olasılığını ortaya atarak sonlandırdılar. Bu tahmin etkin şekilde kanıtlanmış ve hücresel src dizilerinin keşfi, hem normal hücre çoğalmasının hem de insan kanserlerinin moleküler temellerinin anlaşılması için yeni bir kapı açmıştır.

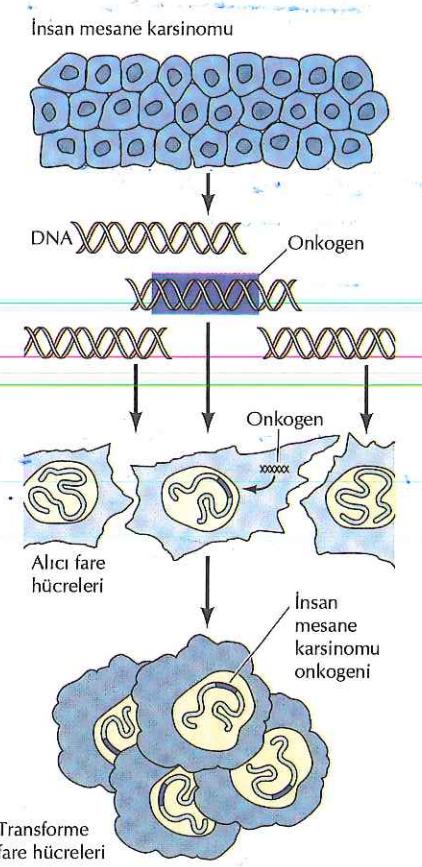
Src gibi onkogen ve protoonkogen proteinleriyle yapılan çalışmalar, normal hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen sinyal yolaklarının çözümlenmesindeki önemlerini kanıtlamıştır. Bunun da ötesinde, src protoonkogeninin keşfi, virusla uyarılmayan tümörlerin ilgili genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabileceği fikrinin doğmasına ve insan tümörlerinde onkogenlerin saptanmasına yol açmıştır. Varmus, Bishop ve arkadaşlarının, tümör virusları, normal hücreler ve virusla uyarılmayan tümörler ile yapılan çalışmaları birleştiren sonuçları, hücre düzenlenmesi ve kanser araştırmalarını hemen her yönden etkilemiştir.

İnsan Kanserlerinde Onkogenler

Retroviral onkogenlerin hücresel genlerden geldiğinin anlaşılması, viruslara bağlı olmayan tümörlerin de protoonkogenlerin mutasyon ya da DNA düzenlenmeleri sonucu değişime uğramasıyla ortaya çıkan hücresel onkogenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadıkları sorusunu akla getirmiştir. İnsan tümörlerinde hücresel onkogenlerin etkinliğine ilişkin ilk bulgu, 1981 yılında Robert Weinberg ile kitabın yazarlarından birinin (GMC) laboratuarlarında gerçekleştirilen gen transfer deneyleri ile elde edilmiştir. Bu deneylerde, insan mesane kanseri hücrelerinden elde edilen DNA'nın, kültür ortamında fare hücrelerini etkin biçimde transforme etmesiyle, insan tümörlerinin de biyolojik açıdan aktif bir hücresel onkogen içerdiği gösterilmiştir (Şekil 15.22). Daha sonra, gerek gen transfer deneyleri, gerekse daha başka deneysel yaklaşımlar birçok farklı insan tümöründe aktif onkogenlerin varlığını ortaya koymuştur (Tablo 15.4).

İnsan tümörlerinde gözlenen onkogenlerin bir bölümü daha önce retroviruslarda tanımlanmış olan onkogenlerin homoloğu iken, bir bölümü ise ilk kez insanlarda tanımlanan yeni onkogenlerdir. Gen transfer deneyleri ile ilk tanımlanan insan onkogeni, Harvey sarkom virusunun (bkz. Tablo 15.3) insan homoloğu olan *ras*H onkogenidir. *ras* gen ailesinin birbiriyle yakından ilişkili üç üyesi (*ras*H, *ras*K ve *ras*N) insan tümörlerinde en sık görülen onkogenlerdir. *ras* genleri insan kanserlerinin yaklaşık %20'sinde, barsak kanserlerinin %50'sinde ve akciğer kanserlerinin %25'inde rol oynar.

Normal hücrelerde *ras* onkogenleri bulunmaz, genellikle tümör gelişimi sırasında gerçekleşen mutasyonlar sonucunda tümör



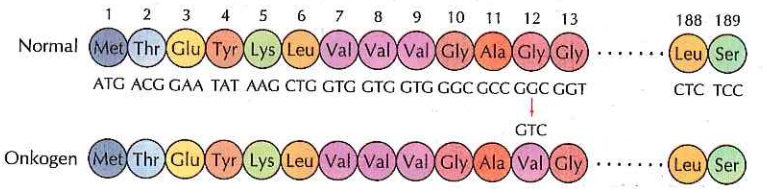
Şekil 15.22 İnsan tümör onkogeninin gen transferi ile saptanması
Fare hücreleri, kültürde, insan mesane karsinomu hücrelerinden elde edilen DNA ile transforme edildiğinde, transformasyonun insan tümöründen gelen bir onkogenin genoma yerleşerek eksprese olmasından kaynaklandığı görülmüştür.

TABLO 15.4 İnsan Tümörleri İle İlgili Onkogenler

Onkogen	Kanser türü	Aktivasyon şekli
abl	Kronik miyeloid lösemi, akut lenfositer lösemi	Translokasyon
akt	Meme,over, pankreas karsinomu	Amplifikasyon
bcl-2	Folliküler B hücreli lenfoma	Translokasyon
D1	Paratiroid adenomu, B hücreli lenfoma	Translokasyon
D1	Skuamöz hücreli, mesane, meme, özofagus, karaciğer ve akciğer karsinomları	Amplifikasyon
E2A/pbx1	Akut lenfositer lösemi	Translokasyon
erbB-2	Meme ve over karsinomu	Amplifikasyon
gip	Adrenalkorteks ve over karsinomu	Nokta mutasyonu
gli	Glioblastom	Amplifikasyon
gsp	Hipofiz ve tiroid tümörleri	Nokta mutasyonu
hox-11	Akut T hücreli lösemi	Translokasyon
lyl	Akut T hücreli lösemi	Translokasyon
c-myc	Burkitt lenfoması	Translokasyon
c-myc	Meme ve akciğer karsinomu	Amplifikasyon
L-myc	Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
N-myc	Nöroblastom, akciğer karsinomu	Amplifikasyon
PDGFR	Kronik miyelomonositik lösemi	Translokasyon
PI3K	Over karsinomu	Amplifikasyon
PML/RARα	Akut promiyelositer lösemi	Translokasyon
B-raf	Melanom, barsak karsinomu	Nokta mutasyonu
rasH	Tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu
rasK	Barsak, akciğer, pankreas ve tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu
rasN	Akut miyeloid ve lenfositik lösemiler, tiroid karsinomu	Nokta mutasyonu
ret	Multipli endokrin neoplazi tip 2A ve2B	Nokta mutasyonu
ret	Tiroid karsinomu	DNA yeniden düzenlenmesi
SMO	Bazal hücreli karsinom	Nokta mutasyonu

hücrelerinde ortaya çıkar. *ras* onkogeni ile hücresel protoonkogen arasındaki tek fark, kritik bölgede gerçekleşen bir tek amino asit değişimidir. Belirlenmiş olan bu değişikliklerden ilki 12. kodonda glisin yerine valin geçmesidir (Şekil 15.23). İnsan tümörlerinde, ras onkogeninde 12. 13. ve 61. kodonlarda gerçekleşen daha başka amino asit değişiklikleri de sık görülür. *ras* protoonkogenini onkogene dönüştüren mutasyonların, kimyasal karsinojenlerin etkisiyle gerçekleştiğini gösteren hayvan deneyleri karsinojenlerin mutajenik etkisi ile hücre transformasyonu arasında doğrudan bağlantı bulunduğunu ortaya koymuştur.

Bölüm 13'de anlatıldığı gibi, *ras* genleri birçok değişik büyüme faktörü reseptöründen gelen mitojenik sinyallerin iletiminde görev yapan, guanin nükleotid bağlayan proteinleri kodlar. Ras proteinlerinin aktivitesi GTP veya GDP bağlanmasına göre değiştiğinden, protein aktif (GTP-bağlı) ve inaktif (GDP-bağlı) durumlar arasında gidip gelir (bkz. Şekil 13.33). *ras* onkogenlerine özgü mutasyonlar, Ras proteininin sürekli olarak, GTP-bağlı aktif durumunu korumasına neden olur.

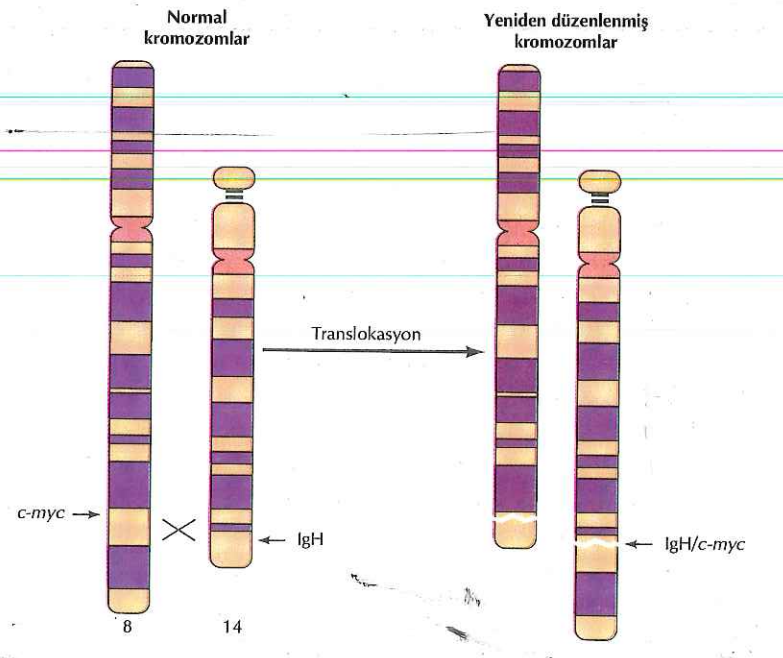


Şekil 15.23 *ras* onkogeninde nokta mutasyonları
Mesane karsinom DNA'sında saptanan *rasH* onkogeninin transformasyon aktivitesinden, 12. kodonda GGC'nin (Glisin) GTC'ye (Valin) dönüşmesine neden olan, bir tek nükleotid değişikliği sorumludur.

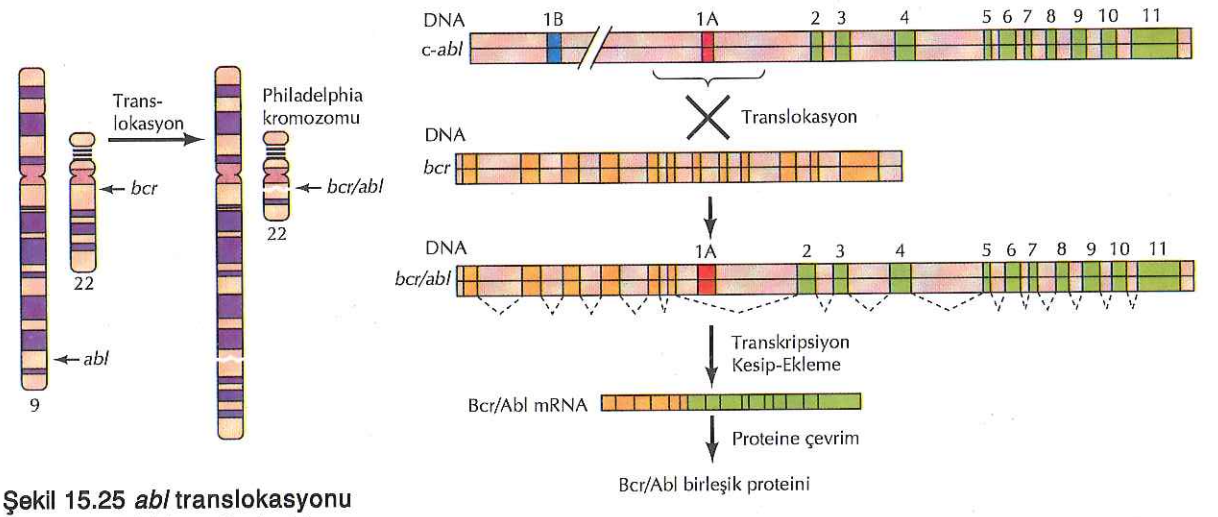
Bu olay büyük ölçüde, normal Ras proteinine bağlı GTP'nin parçalanmasını uyaran GAP'a (GTPaz aktive eden protein) onkojenik Ras'ın yanıt vermemesinden kaynaklanır. Hücre içindeki GTPaz aktivitesinin azalması sonucunda, onkogenik Ras proteinleri aktif, GTP-bağlı durumda kalarak, hücrenin kontrolsuz çoğalmasını uyarır.

Nokta mutasyonları, protoonkogenlerin onkogene dönüşme şekillerinden sadece biridir. Birçok kanser türünde kromozom yapısında translokasyon, duplikasyon ve delesyon gibi anormallikler de görülür. Kromozom translokasyonlarından kaynaklanan gen düzenlenmeleri, sıklıkla onkogenlerin ortaya çıkmasına yol açar. Bazı durumlarda bu düzenlenmelerin incelenmesi bilinen onkogenlerin varlığını gösterirken, bazı gen düzenlenmelerinin analizi ve moleküler klonlama deneyleriyle de yeni onkogenler bulunmuştur.

Kromozom translokasyonu sonucu onkogen aktivasyonuna ilişkin tanımlanmış ilk örnek ***c-myc*** geninin, antikor üreten B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomlarındaki rolüdür (Şekil 15.24). Bu iki tümör de immünglobulinleri kodlayan genlerin translokasyonuyla tanımlanır. Örneğin, hemen tüm Burkitt lenfomalarında 8. kromozomun bir parçasının, translokasyon sonucu 2. kromozom (κ hafif zincir), 14. kromozom (ağır zincir) ya da 22. kromozom (λ hafif zincir) üzerindeki immünglobulin lokuslarından birine taşındığı görülür. Bu tümörlerde immünglobulin genlerinin aktif ekspresyonu, translokasyonun 8. kromosomdaki bir protoonkogeni immünglobulin lokusuna sokarak aktive ettiğini göstermektedir. Bu olasılık, tümör örneklerinde bilinen onkogenlere özgü problar



Şekil 15.24 c-*myc* geninin translokasyonu
Burkitt lenfomasında translokasyon sonucunda 8. kromozomdan 14. kromozomdaki immünglobulin ağır zincir lokusuna taşınan c-*myc* geninin aşırı ekspresyonu görülür.



Şekil 15.25 *abl* translokasyonu
Kronik myeloid lösemilerde abl onkogeninin 9. kromozomdan 22. kromozoma taşınması ile Philadelphia kromozomu ortaya çıkar. İki alternatif birinci eksonu (1A ve 1B) bulunan *abl* geni 22. kromozomdaki *bcr* geninin ortasına yerleşir. Translokasyon sonucunda ekson 1B delesyona uğrar. Birleşen genlerin transkripsiyonu *bcr*'ın promotör bölgesinden başlar ve *abl*'yi de kapsar. Bunu izleyen kesilip-eklenme sonucunda ekson 1A'nın da delesyona uğramasıyla *bcr* dizileri *abl*'nin ikinci eksonu ile birleşir ve ortak Bcr/Abl mRNA molekülü oluşur. Bcr/Abl mRNA'sından rekombinant Bcr/Abl füzyon proteini sentezlenir.

kullanılarak araştırılmış ve sonunda Burkitt lenfomalasında 8. kromozom üzerindeki kırılma noktasında *c-myc* onkogeninin yer aldığı gösterilmiştir. Büyüme faktörlerinin etkisiyle uyarılan sinyal yolunda görev yapan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *c-myc* geninin bu şekilde kontrolsuz ekspresyonu hücreyi sürekli çoğalmaya uyararak tümör gelişimine yardımcı olmaktadır.

Bazı protoonkogenlerin translokasyonu da, genlerin protein kodlayan bölgesinde değişikliklere neden olarak, anormal gen ürünlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. Bu tür transolokasyonların en tipik örneği, kronik myeloid lösemide 9. kromozomdaki ***abl*** protoonkogeninin 22. kromozoma taşınmasıdır (Şekil 15.25). Bu translokasyon sonucunda *abl*, 22. kromozomdaki *bcr* geni ile birleşir. Sonuçta ortaya çıkan Bcr/Abl birleşik proteininde normal Abl proteininin amino ucu yerine Bcr amino ucuna ait diziler bulunur. Proteine Bcr dizilerinin eklenmesi, bir tirozin kinaz olan Abl'nin kontrolsüz aktivitesine neden olarak, hücre transformasyonuna yol açar.

İnsan tümörlerinde onkogenlerin aktifleşme yollarından biri de, genlerin hızlı ve yüksek düzeyde ekspresyonuna neden olan gen amplifikasyonudur. Tümör hücrelerinde, normal hücrelere kıyasla bin kattan daha fazla görülen (bkz. Şekil 5.55) onkogen amplifikasyonu birçok tümörün giderek daha hızlı büyümesine ve daha malin nitelikler kazanmasına neden olur. Tümörlerde amplifikasyonu görülen dizilerin incelenmesi ve moleküler klonlama deneyleri sonucunda yeni onkogenler tanımlanmıştır.

Onkogen amplifikasyonun en tipik örneklerinden biri, nöroblastomlarda (embryonal sinir hücrelerinden gelişen bir çocukluk çağı tümörü) *c-myc* geninin benzeri olan **N-*myc*** genidir. Hızlı gelişen saldırgan tümörlerde, N-*myc* geninin kopya sayısında sıklıkla artış gözlenmesi, *myc* amplifikasyonunun tümörün daha malin şekle dönüşmesine eşlik ettiğini gösterir. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir reseptör kodlayan bir başka onkogen olan *erb* B-2 de, meme ve over kanserlerinde benzer özellikler gösterir.

Onkogen Ürünlerinin İşlevi

Viral ve hücresel onkogenlerin araştırılması sonucunda, malin hücrelerde anormal davranışlara neden olan çok sayıda (toplam 100 kadar) gen tanımlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, protoonkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederler. Bu yüzden bu proteinlerin aşırı ekspresyonu ya da aktivitelerinde artış kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir. Bazı onkogen proteinleri de kanser hücresinin hatalı farklılaşması ya da programlanmış hücre ölümünden etkilenmemesi gibi farklı davranışlarını belirler.

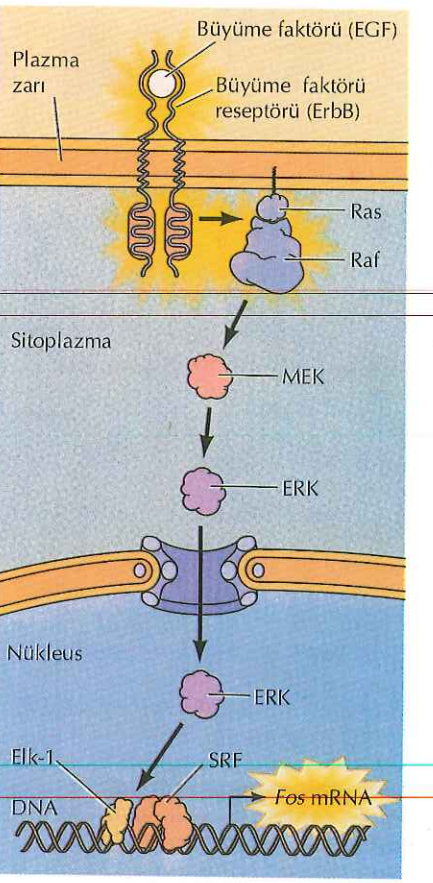
Onkogen proteinlerinin büyük çoğunluğu, büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlı olarak hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yolaklarının birer üyesi olarak görev yaparlar. Bu proteinler arasında polipeptid büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, hücre içi sinyal yolaklarının üyeleri ve transkripsiyon faktörleri yer alır (Şekil 15.26).

Büyüme faktörleri, aşırı eksprese olduklarında, birer onkogen proteini olarak davranabilirler. Bu durumda, tümör hücresi gereksinim duyduğu büyüme faktörlerini kendisi sentezlemeye başlar. Böylece büyüme faktörünü sentezleyen hücre, otokrin olarak uyarılır (bkz. Şekil 15.9), bu da anormal hücre çoğalmasına neden olarak birçok insan tümörünün gelişmesine zemin hazırlar.

Onkogenlerin büyük bir bölümü tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin, hücre dışı büyüme faktörleri ile etkileşen amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler, bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olur. Örneğin, bazı lösemilerde, kromozom translokasyonu sonucunda trombosit (platelet) kökenli büyüme faktörünün (PDGF) normal amino ucunun yerini, Tel adı verilen bir transkripsiyon faktörünün amino ucuna özgü diziler alır (Şekil 15.27). Bu şekilde oluşan, onkojenik Tel/PDGF füzyon proteinlerindeki Tel dizileri, proteinlerin büyüme faktörü ile etkileşmedikleri halde dimerler oluşturmalarına yol açar. Bunun sonucunda, hücre içindeki kinaz bölgesi sürekli aktif durumda kalır ve protein kontrolsüz biçimde çoğalma sinyalleri üretir. Buna karşılık, *erb*B-2 gibi bazı reseptör tirozin kinazları kodlayan genler, gen amplifikasyonu sonucunda aktifleşirler. Daha başka onkogenler ise (*src* ve *abl* de dahil) düzenleyici dizilerde gerçekleşen delesyon veya mutasyonlar nedeniyle sürekli aktif kalan, reseptör olmayan tirozin kinazları kodlar.

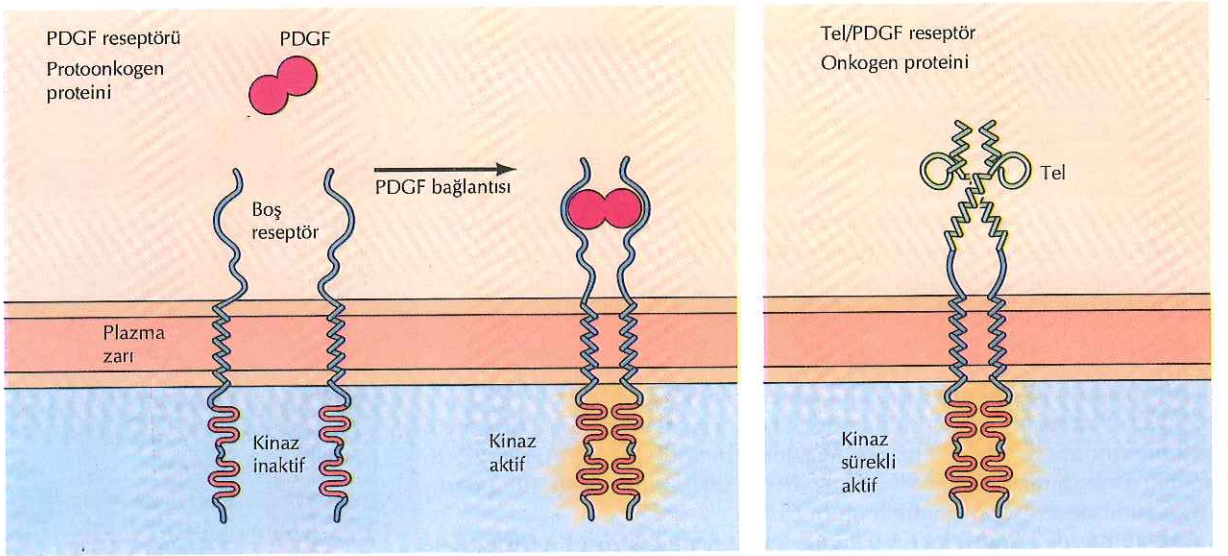
Ras proteinleri, mitojenik sinyal yolunda büyüme faktörü reseptörlerini, Raf protein-serin/treonin kinazların aktivasyonuna bağlayan anahtar rolü üstlenirler. Bu işlem ERK MAP kinazların (bkz. Şekil 13.32) aktifleşmesiyle sonuçlanan protein kinaz kaskadını başlatır. *ras* protoonkogenini onkogene dönüştüren mutasyonlar, daha önce de belirtildiği gibi sürekli Ras aktivitesine yol açarak ERK sinyal yolunu aktifleştirir. *raf* geni de benzer şekilde, Raf proteininin amino ucundaki düzenleyici bölgenin ortadan kalkmasına yol açan delesyonlarla onkogene dönüşür (bkz. Şekil 15.21). Bu delesyonlar Raf protein kinazın kontrolsüz aktivitesine, bu aktivite de sürekli ERK aktivasyonuna neden olur. *Raf* protoonkogeni, yüksek Raf aktivitesine neden olan nokta mutasyonları sonucunda da onkogene dönüşebilir.

ERK sinyal yolu, transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesi ve gen ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanır. Bu yüzden birçok onkogenin de, transkripsiyonu düzenleyen ve normal koşullarda



Şekil 15.26 Onkogenler ve sinyal iletimi

Onkogen proteinleri, büyüme faktörü (örn., EGF), büyüme faktörü reseptörü (örn., ErbB), hücre içi sinyal molekülleri (örn., Ras ve Raf) gibi görevleri yerine getirirler. Ras ve Raf, ERK MAP kinaz sinyal yolunu (bkz. Şekil 13.32 ve 13.35) uyararak transkripsiyonu düzenleyen başka onkojenik proteinleri kodlayan genlerin (örn., *fos*) aktifleşmesine neden olur.

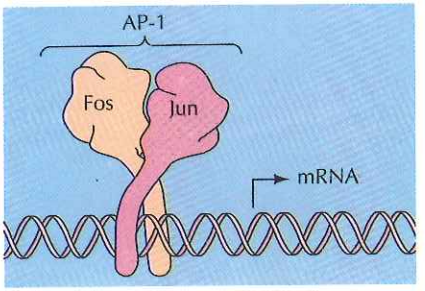


Şekil 15.27 Tel/PDGFR onkogen aktivasyonunun mekanizması
PDGF reseptörü PDGF'in bağlanmasını izleyen dimerleşme sonucunda aktifleşir. Tel/PDGF onkogeninin kodladığı füzyon proteininde PDGF reseptörünün hücre dışındaki normal bölgesinin yerine, Tel transkripsiyon faktörünün amino ucunda yer alan, proteinlerin dimerleşmesinden sorumlu sarmal-ilmik-sarmal bölgesi geçer (bkz. Şekil 6.27). Bu bölgeler PDGF yokluğunda da dimerler kurarak, onkojenik protein kinazın sürekli aktif kalmasına yol açarlar.

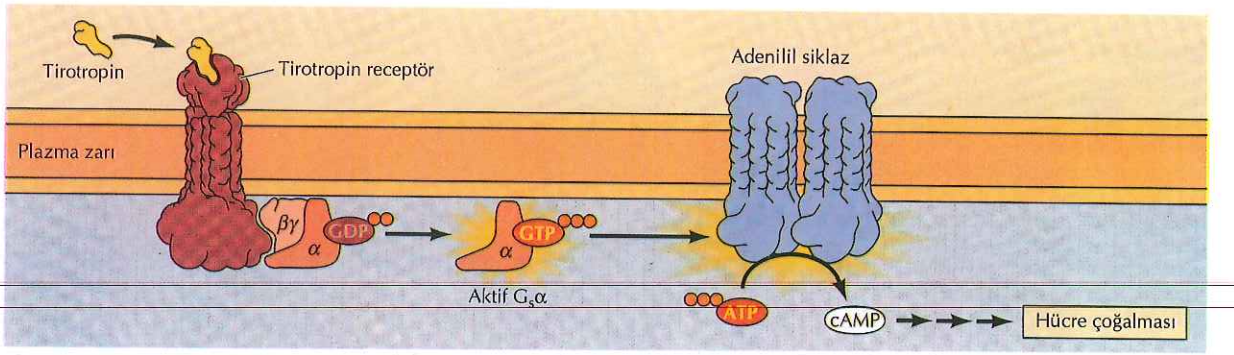
büyüme faktörlerinin uyarısıyla aktifleşen proteinleri kodlaması beklenir. Örneğin, Elk-1'in ERK tarafından fosforillenmesi *fos* protoonkogeninin transkripsiyonunu başlatır (bkz. Şekil 15.26). **Fos** ile, bir başka onkogen ürünü olan **Jun** birlikte transkripsiyon faktörü AP-1'i oluştururlar. Büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücrelerde AP-1, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 15.28). Fos ya da Jun proteinlerinin kontrolsüz ekspresyonu yüzünden AP-1 in sürekli aktif kalması, transformasyona kadar uzanan anormal hücre çoğalmasını başlatmak için yeterlidir. Myc proteinleri de, mitojenik uyaranlara bağlı sinyal yollarında görev yapan transkripsiyon faktörlerindendir ve *myc* onkogeninin anormal ekspresyonu birçok insan tümörünün gelişmesinde rol oynar. İnsan lösemi ve lenfomalarında da, kromozom translokasyonları sonucunda daha başka transkripsiyon faktörleri onkogenlere dönüşerek aktifleşir.

Hedgehog, Wnt, Notch ve G-proteinlerine bağlı sinyal yolları gibi, diğer sinyal yollarının bileşenleri de onkogen gibi davranabilirler. Örneğin, tiroid tümörlerinde, G proteini ile eşleşmiş tirotropin reseptörünü kodlayan gende ortaya çıkan mutasyonlar bu geni bir onkogene dönüştürebilir (Şekil 15.29). Tirotropin, adenilil siklazı aktive eden G-proteinleri ile eşleşmiş bir reseptör aracılığıyla tiroid hücrelerini çoğalmaya uyaran bir hipofiz hormonudur. Tiroid tümörlerinde tirotropin reseptöründe gerçekleşen mutasyonlar reseptörün sürekli aktif kalmasına yol açar ve hücrenin cAMP sinyal yolu üzerinden çoğalmaya uyarılmasıyla sonuçlanır. G proteinlerini kodlayan genler de bazı hücrelerde benzer şekilde onkogen olarak davranabilir. *ras* geninde gördüğümüz nokta mutasyonlarına benzer mutasyonlar sonucunda, G_s nin α alt birimini kodlayan *gsp* onkogeni ortaya çıkar. Bu mutasyonlar $G_s\alpha$ alt biriminin sürekli aktif durumda kalmasına yol açarak, adenilil siklazın kontrolsüz uyarılmasına neden olur. *gsp* onkogeni hücre çoğalmasının cAMP üzerinden uyarıldığı tiroid ve hipofiz tümörleri ile ilişkilidir. G proteinlerinin diğer α alt birimlerini kodlayan genler de, adrenal ve over tümörleri gibi hücrelerde benzer mutasyonlarla onkogene dönüşürler.

Büyüme faktörlerinin uyarmasıyla aktive olan hücre içi sinyal iletim yolakları, sonunda hücre döngüsü bileşenlerini düzenleyerek, G_1'deki kontrol noktasından geçişi sağlar. Büyüme faktörü uyarımına



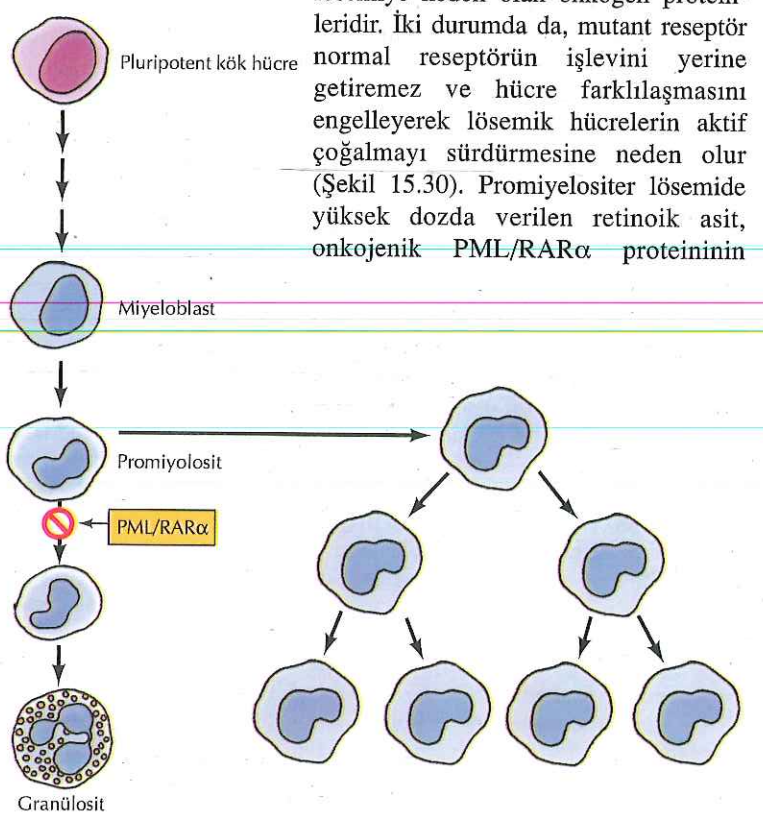
Şekil 15.28 AP-1 transkripsiyon faktörü
Fos ve Jun dimerleşerek AP-1'i oluştururlar. AP-1, büyüme faktörleri tarafından uyarılan birçok değişik genin transkripsiyonunu başlatır.



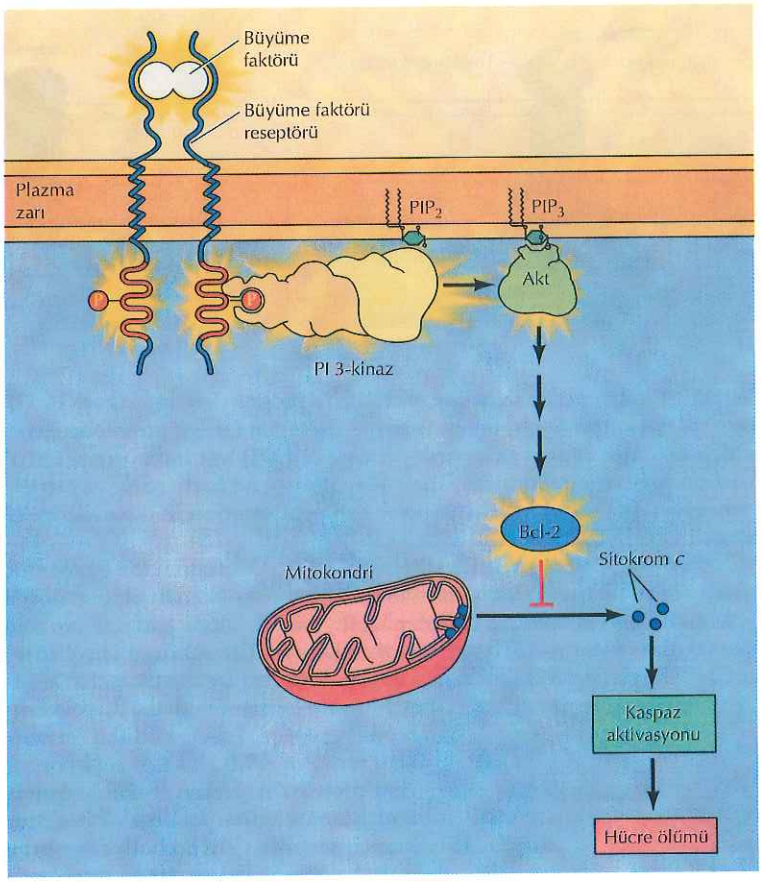
Şekil 15.29 G-proteini ile eşleşmiş reseptörler ile G-proteinlerinin onkojenik aktivitesi
Tirotropin reseptörü G_s aracılığıyla adenilil siklazı aktifleştirir. Gerek reseptörü, gerekse $G_s\alpha$ altbirimini kodlayan genler, tiroid hücrelerini çoğalmaya uyaran birer onkogen olarak davranabilirler.

yanıt olarak D-tipi siklinler uyarılır ve büyüme faktörü uyarımını hücre döngüsü ilerlemesini eleştirir (Şekil 14.19 bakınız). Bu yüzden, siklin D1'i kodlayan genin, kromozom translokasyonu ya da gen amplifikasyonu sonucunda aktifleşebilen (***D1*** adı verilen) bir onkogen olması şaşırtıcı değildir. Söz konusu değişiklikler, siklin D1'in sürekli aktif durumda kalmasına ve hücre çoğalmasının büyüme faktörü yokluğunda da sürmesine neden olur.

Onkogenlerin çoğu hücre çoğalmasını uyardıkları halde, bazı transkripsiyon faktörleri onkojenik etkilerini, hücrenin farklılaşmasını engelleyerek gösterirler. Tiroid hormonu ile retinoik asit, Bölüm 13'de belirtildiği gibi, birçok hücre türünde farklılaşmayı başlatan faktörlerdir. Bu hormonlar zardan geçerek, hücre içinde transkripsiyonu düzenleyen reseptörlerine bağlanırlar. Tiroid hormon reseptörü (**ErbA**) ile retinoik asit reseptörünün (**PML/RARα**) mutant formları, sırasıyla tavuklarda eritrolösemiye ve insanda promiyelositer lösemiye neden olan onkogen proteinleridir. İki durumda da, mutant reseptör normal reseptörün işlevini yerine getiremez ve hücre farklılaşmasını engelleyerek lösemik hücrelerin aktif çoğalmayı sürdürmesine neden olur (Şekil 15.30). Promiyelositer lösemide yüksek dozda verilen retinoik asit, onkojenik PML/RARα proteininin



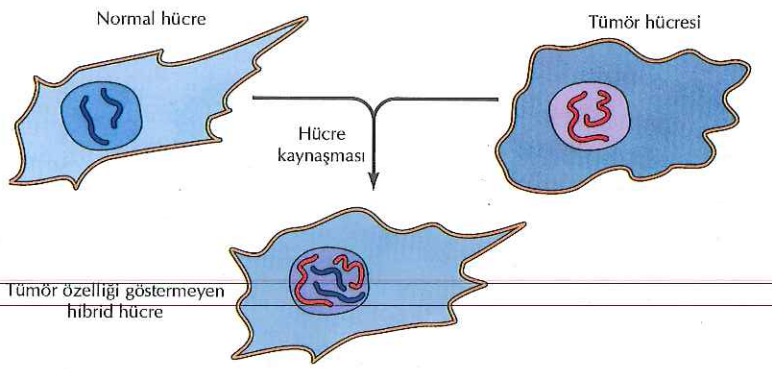
Şekil 15.30 PML/RARα onkogen proteininin işlevi
PML/RARα füzyon proteini promyelositlerin farklılaşarak granülosite dönüşmesini engeller.



Şekil 15.31 Onkogenez ve hücre sağ kalımı
Büyüme faktörü, büyüme faktörü reseptörü, PI 3-kinaz ve Akt gibi onkogen proteinleri hücrede sağ kalımı uyaran sinyaller üretir. PI3-kinaz/Akt yolağı Bcl-2 ailesi üyelerini denetleyerek, hücre sağ kalımını, mitokondriden sitokrom C salınımını engelleyerek sağlar.

etkisini ortadan kaldırarak, lösemik hücrelerin farklılaşmasını başlatabilir. Bu biyolojik gözlem klinik açıdan da önem taşır. Retinoik asit farklılaşmayı başlatan ve sürekli hücre çoğalmasını durduran etkisi nedeniyle akut promyelositer lösemili hastaların tedavisinde kullanılır.

Bu bölümde daha önce anlatıldığı gibi kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden, yani apoptozdan etkilenmemesi tümör gelişimi açısından önemli bir faktördür. Birçok onkogen hücrenin sağ kalmasını uyaran proteinleri kodlar (Şekil 15.31). Canlıların çoğunda hücre sağ kalımı, büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlıdır. Bu yüzden, büyüme faktörü, büyüme faktörü reseptörü ve Ras gibi sinyal proteinlerini kodlayan onkogenler hücre proliferasyonunu uyarmak yanında, aynı zamanda hücre ölümünü de engeller. PI 3-kinaz/Akt sinyal yolu, Bölüm 13'de anlatıldığı gibi, büyüme faktörüne bağımlı birçok hücrede anahtar rol oynar. **PI3-kinaz** ile **Akt** hem retroviruslarda, hem de insan tümörlerinde onkogen olarak etki gösterir. PI 3-kinaz/Akt sinyal yolağının aşağı yöndeki hedefleri arasında Bcl-2 ailesinin bir üyesi (Bad) de yer alır. **Bcl-2,** ilk kez insan lenfomalarında tanımlanan bir onkogendir. Bcl-2, hücreyi ölüme götüren durumlarda apoptozu engelleyerek hücre sağ kalımını destekler. Bcl-2'nin yüksek oranda ekspresyonuna yol açan bir kromozom translokasyonu sonucunda, *bcl-2* onkogeni oluşur. Bcl-2'nin onkogen olarak etkisi, programlı hücre ölümünün kanser gelişimi açısından önemini gösteren ilk bulgudur. *C.elegans*'tan insana kadar birçok değişik organizmada Bcl-2 ailesinde yer alan genlerin apoptozun kontrolündeki rolleri aydınlatılmıştır.



Şekil 15.32 Hücre kaynaşmasıyla tümör özelliklerinin baskılanması
Tümör hücrelerinin normal hücre ile kaynaşması sonucunda, iki hücreden de gelen kromozomları içeren hibrid hücreler ortaya çıkar. Bu hücreler genellikle tümör özellikleri taşımaz.

Tümör Baskılayıcı Genler

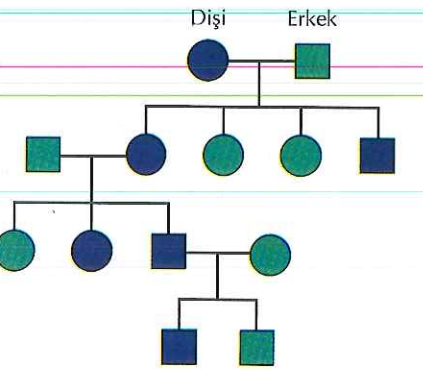
Hücresel onkogenlerin aktivasyonu, tümör gelişmesi ile ilgili iki temel genetik değişiklikten birincisidir, diğeri, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Onkogenler, gen ekspresyonunu hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise, hücre çoğalmasının kontrolünde bunun tam tersi mekanizmayı simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılarlar. Birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması nedeniyle hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücreleri anormal çoğalma olanağına kavuşur.

Tümör Baskılayıcı Genlerin Tanımlanması

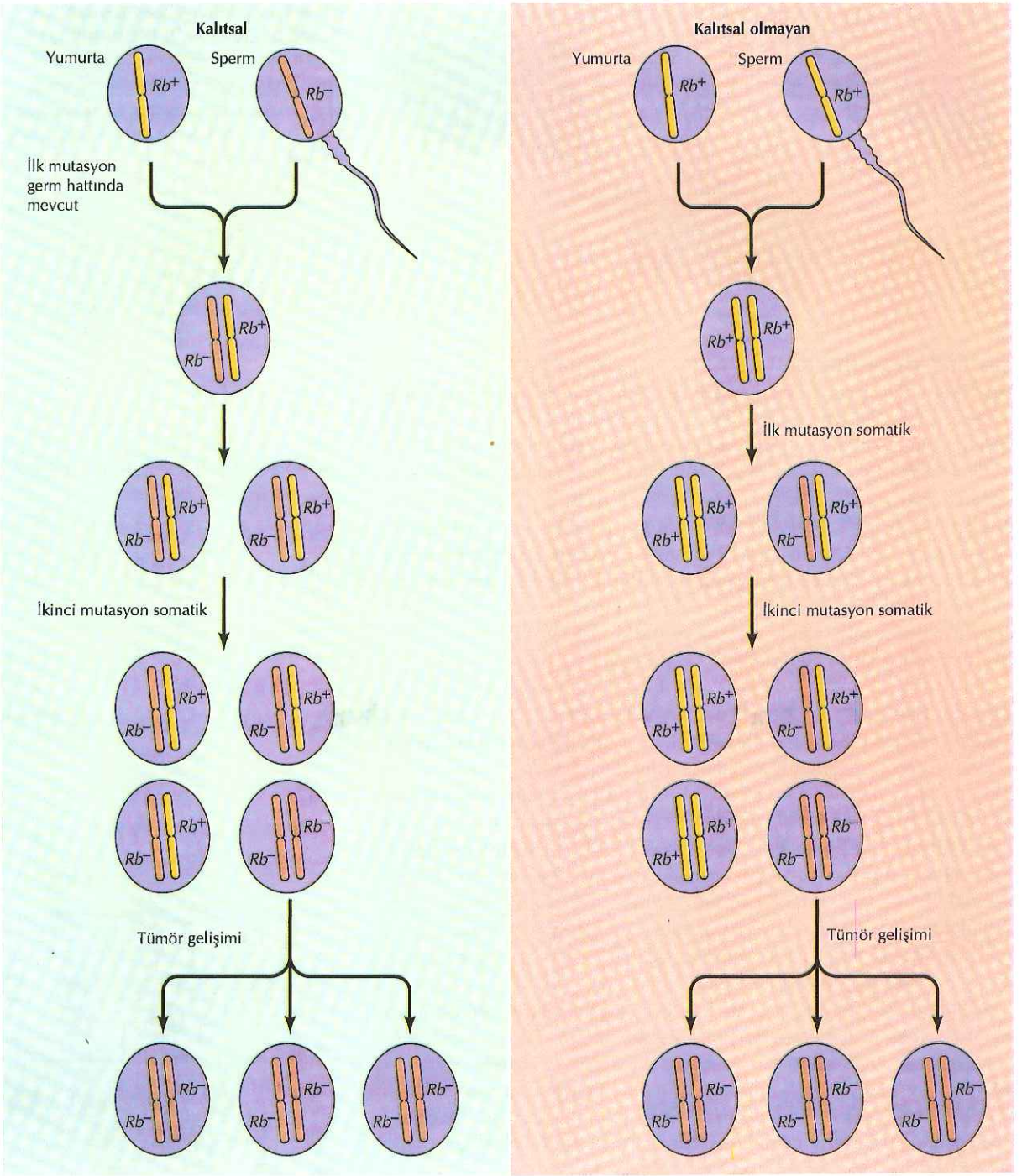
Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu gösteren ilk bulgular, Henry Harris ve arkadaşları tarafından 1969 yılında başlatılan, somatik hücre hibridizasyon deneyleriyle elde edilmiştir. Normal hücrelerin tümör hücreleri ile birleştirilmesiyle, iki hücreden de gelen kromozomları içeren hibrid hücreler ortaya çıkar (Şekil 15.32). Bu hücreler genelde, hayvanlarda tümör oluşturma yeteneğine sahip değildir. Bu yüzden normal hücreden gelen genlerin tümör gelişimini baskıladığı düşünülmüştür. Ancak bu genlerin moleküler düzeyde tanımlanması başka bir yaklaşımla, ender görülen kalıtsal, insan kanser türlerinin analizi sayesinde mümkün olmuştur.

İlk tümör baskılayıcı gen, ender görülen bir çocukluk tümörü olan retinoblastomun incelenmesi ile tanımlanmıştır. Erken saptandığı takdirde retinoblastom başarıyla tedavi edilebilir ve hastalar yaşar ve aile kurabilirler. Hasta ailelerinin incelenmesi sonucunda, bazı retinoblastom vakalarının kalıtsal olduğu anlaşılmıştır. Hastalık, ebeveynleri etkilenmiş çocukların yaklaşık %50'sinde ortaya çıkar, bu, tümör gelişimine yatkınlık nedeni olan tek bir dominant genin Mendelyan geçişi ile uyumludur (Şekil 15.33).

Retinoblastoma yatkınlık, dominant bir karakter olarak taşındığı halde, yatkınlık geninin varlığı normal retina hücresinin tümör hücresine dönüşmesi için yeterli değildir. Duyarlılık geni hastanın tüm retina hücrelerinde bulunduğu halde, bunların sadece bir bölümünde tümör gelişir. Bu yüzden tümör gelişimi için kalıtsal yatkınlık dışında daha başka olaylar da gereklidir. Alfred Knudson 1971 yılında retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Günümüzde bunun, normal bir diploid hücredeki homolog kromozomlar üzerinde yer alan yatkınlık geninin (**Rb** tümör



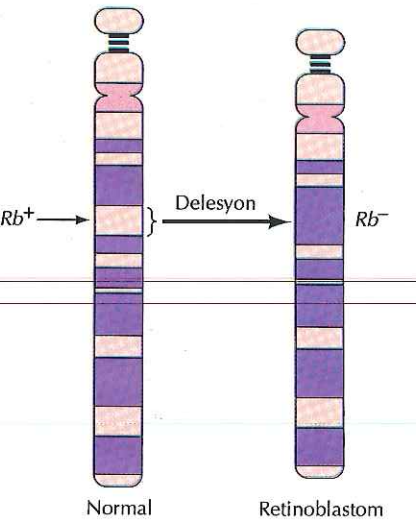
Şekil 15.33 Retinoblastom kalıtımı
Retinoblastoma yatkınlık, bir sonraki kuşaktaki bireylerin yaklaşık %50'sinde ortaya çıkar. Hasta ve sağlam bireyler sırasıyla mor ve yeşil sembollerle gösterilmiştir.



Şekil 15.34 Retinoblastom gelişiminde *Rb* mutasyonları
Kalıtsal retinoblastomda kalıtım yoluyla, etkilenmiş ebeveynden Rb geninin hatalı kopyası (Rb^-) gelir. Retina hücrelerindeki tek normal kopyada (Rb^+) gerçekleşen yeni bir mutasyon bu kopyanın da ortadan kalkmasına neden olarak hastalığı başlatır. Kalıtsal olmayan olgularda genin ebeveynlerden gelen iki kopyası da sağlam olduğundan, hastalık ancak somatik mutasyonlar sonucunda aynı hücrede iki Rb kopyasının birden inaktive olmasıyla ortaya çıkabilir.

baskılayıcı geni) iki sağlam kopyasının da ortadan kalkması gerektiği anlamına geldiği bilinmektedir. (Şekil 15.34). Kalıtsal retinoblastomda *Rb* geninin bir kusurlu kopyası genetik olarak kalıtılır. Genin bir kopyasının bu şekilde ortadan kalkması, tümör gelişimini başlatmak için tek başına yeterli değildir. Bu bireylerde, kalan normal Rb allelinin de işlevini yitirmesine neden olan ikinci bir somatik mutasyonun ortaya çıkması sonucunda retinoblastom gelişir. Kalıtsal olmayan retinoblastomda hastalığın ortaya çıkması için, sağlam iki allelin de işlevini ortadan kaldıracak, birbirinden bağımsız, iki ayrı mutasyon gerçekleşmesi gerektiğinden, hastalığın bu şekli oldukça ender görülür.

Rb geninin tümör oluşumunda negatif düzenleyici olarak oynadığı işlevsel rol, ilk olarak kromozom morfolojisi gözlemleri ile fark edilmiştir. Bazı hastalarda, kromozom 13q14 bölgesinde görülebilir delesyonların saptanması, tümör gelişmesinden *Rb* geninin kaybının (aktivasyonu değil) sorumlu olduğuna işaret etmiştir (Şekil 15.35). Daha sonraki gen haritalama çalışmalarıyla, tümör gelişiminin tümör hücrelerindeki normal *Rb* allellerinin ortadan kalkmasına bağlı olduğunun gösterilmesi, *Rb*'nin bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü doğrulamıştır. Sonunda, 1986 yılında *Rb* geninin klonlanması ile, retinoblastomlarda Rb geninin mutasyona uğradığı ya da ortadan kalktığı gösterilmiştir. Gen aktarımı deneyleriyle retinoblastom hücrelerine genin normal kopyası verildiğinde, tümör hücresine özgü özelliklerin kaybolması, *Rb*'nin tümör baskılayıcı olarak aktivite gösterdiğini kesin olarak kanıtlamıştır.

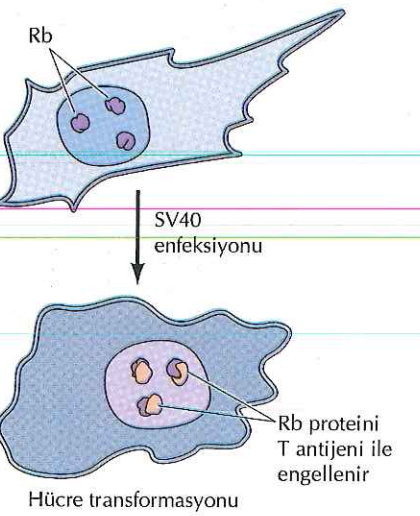


Şekil 15.35 Retinoblastomda Rb delesyonu
Birçok retinoblastom hastasında *Rb* geninin bulunduğu kromozom lokusunda (13q14) delesyonlar görülür.

Rb, ender görülen bir çocukluk çağı tümöründe saptanmakla birlikte, daha sık görülen erişkin tümörlerinde de rol oynar. Klonlanan gen ile yapılan çalışmalar; mesane, meme ve akciğer kanserlerinin birçoğunda da *Rb*'nin ortadan kalktığını ya da inaktive olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, *Rb*'nin tümör baskılayıcı gen olarak öneminin retinoblastom ile sınırlı olmadığı, sık görülen kanser türlerinin birçoğunda da rol oynadığı düşünülmektedir. Bütün bunlara ek olarak, daha önce de belirtildiği gibi, Rb proteini SV40, adenoviruslar, insan papillomavirusları ve Kaposi Sarkomu ile ilişkili herpervirus gibi çok sayıda DNA tümör virusunun onkojenik proteinlerinin başlıca hedefidir (Şekil 15.36). Ancak bu viruslar ile transformasyon, *Rb* geninin mutasyonu yoluyla değil, Rb'nin protein düzeyinde inaktivasyonu sonucunda gerçekleşir.

Rb'nin tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanması birçok değişik kanser türü ile ilişkili yeni tümör baskılayıcı genlerin saptanması için örnek oluşturmuştur (Tablo 15.5). Bu genlerin bazıları, ender görülen kalıtsal kanserlerin nedeni olarak Rb'nin retinoblastomda oynadığı role benzer rol oynarken, başka tümör baskılayıcı genler de erişkinlerde sık görülen ve kalıtsal nitelik taşımayan (barsak kanseri gibi) kanser türlerinde sıklıkla mutasyonu ya da delesyonu gözlenen genler olarak ortaya çıkmıştır. İki durumda da, birçok tümör baskılayıcı genin hem kalıtsal, hem de kalıtsal olmayan kanser türlerinin ortaya çıkmasında rol oynadığı görülmektedir. Gerçekten, tümör baskılayıcı genlerde ortaya çıkan bazı mutasyonlar, insanda tümör gelişimine neden olan moleküler değişiklikler içinde, en sık görülenlerdendir.

İkinci olarak tanımlanan tümör baskılayıcı gen; lösemi, lenfoma, sarkom ve beyin tümörleri ile meme, barsak ve akciğer karsinomları gibi birçok değişik insan kanserinde sıklıkla işlevini kaybettiği görülen



Şekil 15.36 Rb'nin DNA tümör viruslarının proteinleri ile etkileşimi
Birçok DNA virusunun onkogen proteinleri (örn., SV40 T antijeni) Rb'ye bağlanıp aktivitesini engelleyerek transformasyona neden olur.

TABLO 15.5 Tümör Baskılayıcı Genler

Gen	Kanser türü
APC	Kolon/rektum karsinomu
BRCA1	Meme ve over karsinomları
BRCA2	Meme karsinomu
INK4	Melanom, akciğer karsinomu, beyin tümörleri, lösemiler, lenfomalar
NF1	Nörofibrosarkom
NF2	Meningiom
p53	Beyin tümörleri, meme, kolon/rektum, özofagus, karaciğer ve akciğer karsinomları, sarkomlar, lösemi ve lenfomalar
PTC	Bazal hücreli karsinom
PTEN	Beyin tümörleri, melanom, prostat, endometrium, böbrek ve akciğer karsinomları
Rb	Retinoblastom, sarkomlar, mesane, meme ve akciğer karsinomları
Smad2	Kolon/rektum karsinomu
Smad4	Kolon/rektum karsinomu, pankreas karsinomu
TβRII	Kolon/rektum karsinomu, mide karsinomu
VHL	Renal hücreli karsinom
WT1	Wilms tümörü

p53 tür. Toplam olarak *p53* mutasyonları kanserlerin %50'sinde rol oynadığından, bu gen insan kanserlerinde en sık etkilenen hedeftir. Ayrıca kalıtsal *p53* mutasyonları, ender görülen ve mutasyonu taşıyan bireylerde belirli kanser türlerinin ortaya çıkmasına neden olan kalıtsal bir kanser sendromunun kuşaktan kuşağa iletilmesinden de sorumludur. p53 proteini aynı zamanda (Rb gibi), SV40, adenoviruslar, insan papillomavirusları ve Kaposi Sarkomu- ilişkili herpesvirusun onkojenik proteinlerinin de hedefidir.

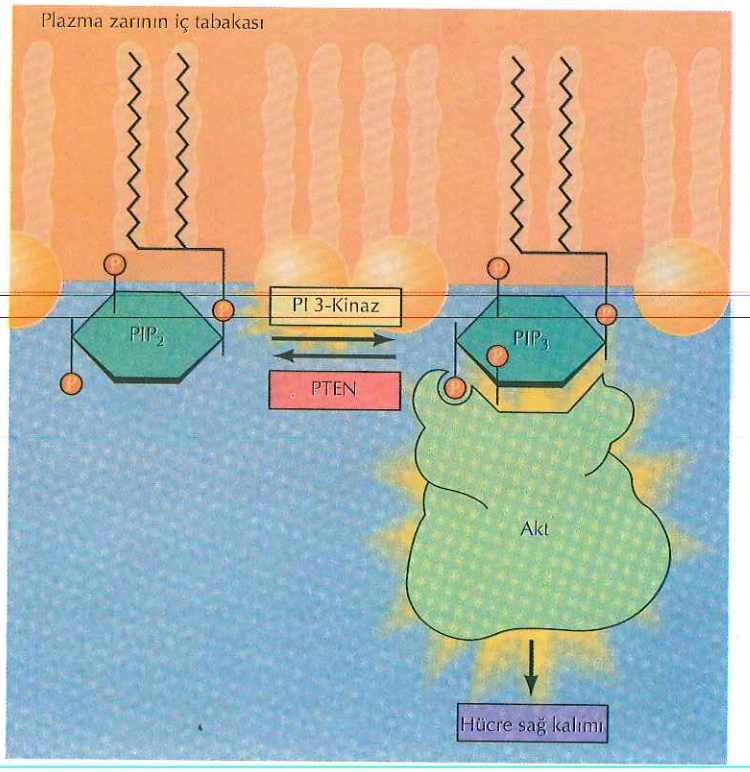
Akciğer ve prostat kanseri ile melanom gibi çok görülen birçok kanser türünde, *p53*'ten başka *INK4* ve *PTEN* genlerinde de sıklıkla mutasyon gözlenir. Daha başka (*APC, TβRII, Smad2* ve *Smad 4* gibi) tümör baskılayıcı genlerin mutasyonuna ise, özellikle barsak tümörlerinde sık rastlanır. Kalıtsal APC mutasyonları, sık görülen yetişkin kanserleri yanında, barsak kanserinin ender rastlanan, kalıtsal bir türünden (Ailesel Adenomatöz Polipoz) sorumludur. Bu mutasyonu taşıyan hastaların barsağında, yüzlerce selim adenom (polip) gelişir ve bunların bir bölümü zamanla malin nitelik kazanır. Başka iki tümör baskılayıcı gende (*BRCA1* ve *BRCA2*) görülen kalıtsal mutasyonlar da, toplam meme kanseri vakaları içinde %5–10 kadarını oluşturan kalıtsal meme kanserinden sorumludur. Beyin tümörleri, pankreas kanseri, ve bazal hücreli deri karsinomları ile Wilms tümörü gibi ender görülen değişik kanser sendromlarının gelişiminde de, daha başka tümör baskılayıcı genlerin ilişkisi bulunmuştur.

Tümör Baskılayıcı Gen Ürünlerinin İşlevleri

Protoonkogen ve onkogen proteinlerinin aksine, tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Bu yüzden tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinleri ortadan kaldırarak tümör gelişmesine neden olur. Tümör baskılayıcı proteinler, çoğunlukla onkogenler tarafından uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar.

Tümör baskılayıcı ***PTEN*** geninin kodladığı protein, onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünleri arasındaki antagonizmin tipik bir örneğidir (Şekil 15.37). *PTEN* proteini, fosfatidilinositol 3,4,5-bisfosfat (PIP_3) gibi, fosfatidilinositidlerin 3, pozisyonundaki fosfatı uzaklaştıran bir lipid fosfatazdır. PIP_3 ün defosforilasyonu yoluyla PTEN, hücre sağ kalımını destekleyen ve onkogen olarak etki gösteren PI 3-kinaz ile Akt'ın etkilerini ortadan kaldırır. PTEN proteininin inaktivasyonu ya da ortadan kalkması, PIP_3 düzeyinin artmasına, Akt'ın aktivasyonuna ve programlı hücre ölümünün engellenmesine neden olarak tümör gelişmesini hızlandırır.

Gerek onkogen, gerekse tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinler, Hedgehog sinyal yolunda da görev yaparlar (bkz. Şekil 13.45). Smoothened reseptörü bazal hücreli karsinomlarda etkili

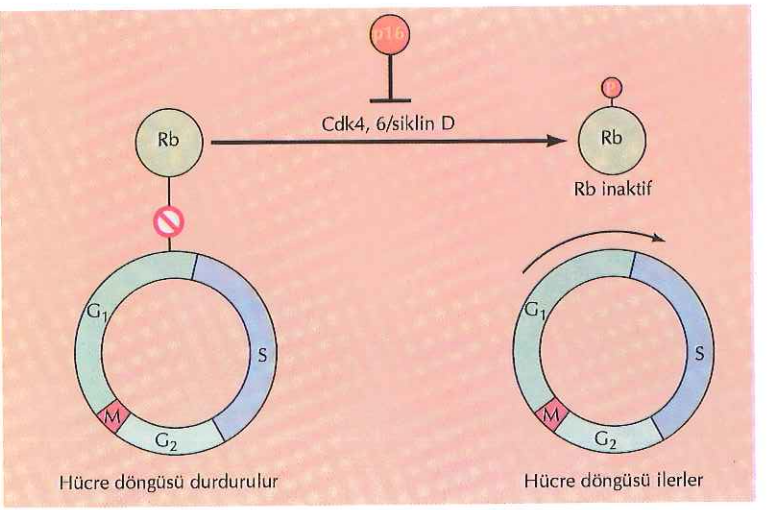


Şekil 15.37 Hücre sağ kalımının PTEN tarafından baskılanması
PTEN tümör baskılayıcı proteini, inositolün 3. pozisyonundaki fosfatı çıkartarak PIP_3'ü PIP_2'ye dönüştüren bir lipid fosfatazdır. Böylelikle PTEN hücre sağ kalımını uyaran onkojenik PI 3-kinaz ve Akt proteinlerinin etkisini engeller.

olan bir onkogen, buna karşılık Patched (Smoothened'in negatif düzenleyicisi) ise bir tümör baskılayıcı gendir. Gli proteinleri de (Smoothened tarafından aktifleştirilen *Drosophila* transkripsiyon faktörü Ci'nin memelilerdeki homoloğu), amplifikasyonu gözlenen ilk onkogenin ürünleridir.

Tümör baskılayıcı genlerin bir çoğu, transkripsiyonu düzenleyen proteinler kodlar. Bunların en iyi örneklerinden biri Wilms tümöründe (çocukluk çağı böbrek tümörü) inaktivasyonu görülen *WT1* dir. WT1 proteini büyüme faktörlerinin etkisiyle aktifleşen ve çok sayıda genin transkripsiyonunu engellediği düşünülen bir baskılayıcıdır. WT1'in hedeflerinden biri, Wilms tümöründe aşırı ekspresyonu görülen ve otokrin bir büyüme faktörü gibi davranarak tümör gelişmesine zemin hazırlayan insülin benzeri büyüme faktörü II'yi kodlayan gendir. Bu yüzden WT1'in inaktivasyonu, büyüme faktörünün anormal ekspresyonu ve dolayısıyla tümör hücrelerinin çoğalmasıyla sonuçlanır. Başka iki tümör baskılayıcı gen de (*Smad2* ile *Smad4*) TGF-β sinyali ile aktifleşen ve hücre çoğalmasını engelleyen transkripsiyon faktörlerini kodlar. TGF-β sinyal yolunun hücre çoğalmasını engelleyen aktivitesi ile uyumlu olarak, TGF-β reseptörü de bir tümör baskılayıcı gen tarafından (*TβRII*) kodlanır.

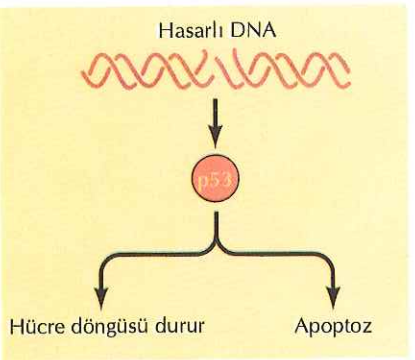
Rb ve *INK4* tümör baskılayıcı genlerinin ürünleri, hücre döngüsünü siklin D1 ile aynı noktada etkiler (Şekil 15.38). Rb, hücre döngüsünün ilerlemesini ve DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, hücre döngüsünü G1 kontrol noktasında durdurur (bkz. Şekil 14.20). Normal hücrelerde kontrol noktasından geçiş, Rb'yi fosforilleyerek inaktive eden Cdk4, 6/Siklin D kompleksi tarafından düzenlenir. Bu yüzden tümörlerde, *Rb*'nin mutasyon ile inaktifleşmesi hücre döngüsünün temel negatif düzenleyicisi rolünü ortadan kaldırır. Cdk inhibitörü p16'yı kodlayan *INK4* tümör baskılayıcı geni de, aynı kontrol noktasından geçişi



Şekil 15.38 Hücre döngüsünün Rb ve p16 tarafından inhibisyonu
Rb, hücre döngüsünü G_1 kontrol noktasında durdurur. Cdk4,6/Siklin D kompleksi Rb'yi fosfatlayarak aktivitesini durdurur ve kontrol noktasından geçişi sağlar. p16 ise, Cdk4,6/Siklin D kompleksinin aktivitesini engeller.

düzenler. Bölüm 14'de anlatıldığı gibi, p16 Cdk4,6/siklin D aktivitesini baskılar. Bu yüzden *INK4*'ün inaktivasyonu, Cdk4,6/siklin D kompleksinin aktivitesinde artışa yol açarak Rb'nin kontrolsüz fosforilasyonu ile sonuçlanır.

P53 geninin ürünü hem hücre döngüsünün ilerlemesini, hem de apoptozu düzenler (Şekil 15.39). DNA hasarı p53 sentezini indükler, p53 de Cdk inhibitörü p21'in transkripsiyonunu hızlandırır (bkz. Şekil 14.21). p21, bir yandan Cdk/siklin kompleksinin genel inhibitörü olarak, diğer yandan da PCNA'ya (çoğalan hücre nükleer antijeni) bağlanarak DNA'nın replikasyonunu engeller ve hücre döngüsünü durdurur. Hücre döngüsünün durması replikasyondan önce hasarlı DNA'nın onarımı için zaman kazandırır. p53'ün kaybı, hücre hasarına bağlı bu duraklamayı ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına ve hücre genomunda kararsızlığa neden olur. Bu tür genetik kararsızlık, kanser hücrelerinin ortak özelliğidir. Bu özellik, tümör gelişimi sırasında onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde yeni değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur. İşlevleri henüz tam bilinmemekle birlikte, kalıtsal meme ve over kanserlerinin bir bölümünden sorumlu *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin ürünleri de hücre döngüsünün kontrolü ile ilişkilidir.



Şekil 15.39 p53'ün etkisi
DNA hasarı oluştuğunda p53 hem hücre döngüsünü durdurmak, hem de apoptoz için gereklidir.

p53, hücre döngüsünü düzenlemesinin yanısıra, DNA hasarı sonucunda ortaya çıkan apoptoz için de gereklidir. p53'ün apoptoz üzerindeki etkisi, Bcl-2 ailesinin, hücre ölümünü başlatan bir üyesinin (PUMA) transkripsiyonunu aktifleştirmekle başlar. Normal memeli hücrelerinde onarılamayan DNA hasarı apoptozu başlatır. Bu olay hücre için zararlı mutasyon taşıyan (dolayısıyla kanserleşme olasılığı yüksek) hücreleri ortadan kaldırdığından organizma için önemli avantajlar sağlar. p53'den yoksun hücreler, DNA hasarına yol açan radyasyon veya kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi ajanların etkisiyle apoptoza girmez. DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi, tümörlerin kemoterapiye direnç göstermesine neden olur. p53'ün kaybı buna ek olarak büyüme faktörü eksikliği ya da oksijen yokluğu gibi başka uyaranlara bağlı olarak gerçekleşen apoptozu de engeller. p53'ün hücre sağ kalımı üzerindeki bu etkisi, insan tümörlerinde p53 mutasyonlarının çok sık gözlenmesini açıklar.

Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Tümör Gelişimindeki Rolleri

Daha önce de anlatıldığı gibi, kanser gelişimi normal hücrelerin giderek daha malin nitelik kazandığı, çok aşamalı bir süreçtir. Tümör başlangıcı ve gelişiminde, gerek onkogenlerin aktivasyonu, gerekse tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik birer aşamadır. Çok sayıda gende biriken hasar, sonunda, kanser hücresine anormal çoğalma ve yayılma ile metastaz potansiyelinde artış gibi karakteristik özelliklerini kazandırır.

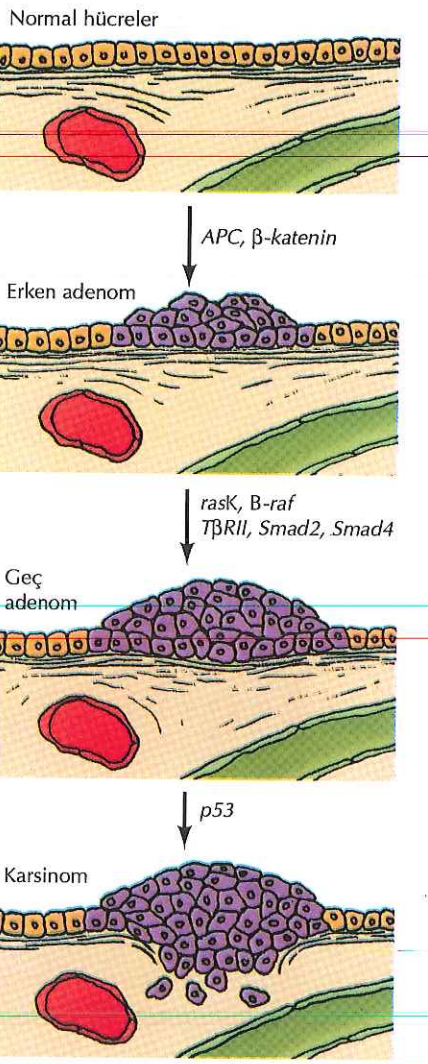
Çok sayıda genetik hatanın rolü en iyi, Bert Vogelstein ve arkadaşları tarafından ayrıntılı biçimde araştırılan, kolon karsinomu modelinde anlaşılır. Bu tümörlerde dört farklı aktiviteye sahip onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla mutasyon görülür: 1) ERK sinyal yolunu etkileyen *ras* ve *raf* onkogenleri, 2) Wnt sinyal yolunun bileşenleri olan tümör baskılayıcı veya onkogenler, 3) TGF-β sinyal yolunda görev yapan tümör baskılayıcı proteinler ve 4) *p53*. Kolon kanseri gelişiminde belirli aşamaları temsil eden lezyonlar ameliyat ile düzenli olarak çıkartılabildiğinden, bu değişiklikleri tümör gelişiminin belirgin aşamaları ile ilişkilendirmek mümkün olmuştur (Şekil 15.40).

Bu çalışmalar, APC (Wnt sinyal yolunun bir bileşeni) inaktivasyonunun (bkz. Şekil 13.46) tümör gelişiminde erken bir olay olduğunu göstermektedir. ailesel adenomatöz polipozlu hastalarda, mutant APC geninin genetik aktarımı, barsak hücrelerinin anormal çoğalmasına ve hastalarda çok sayıda adenom gelişmesine neden olur. APC mutasyonları, kalıtsal olmayan barsak karsinomlarında da sık görülür ve genellikle hastalığın erken aşamasında saptanır. Bazı durumlarda ise Wnt sinyal yolunun aktifleşmesi, APC geninde değil, Wnt sinyal yolunda APC den daha aşağıda yer alan β-katenini kodlayan gendeki mutasyonların sonucudur.

Daha sonra *ras*K geninde mutasyonlar ortaya çıkar, *ras*K mutasyonları barsak adenomlarında sık görülür. Bazı barsak tümörlerinde, *rasK* yerine *raf* onkogen ailesinin bir üyesini (B-*raf*) aktifleştiren mutasyonlar bulunur. Raf, Ras'ın hemen altında yer aldığından, *ras*K ya da B-*raf* genlerinden birinin mutasyon sonucu aktifleşmesi hücrede ERK sinyal yolunun uyarılmasına yol açar.

Hemen tüm barsak kanserlerinde TGF-β sinyal yolunu etkileyen mutasyonlar bulunur. TGF-β sinyal yolu Cdk inhibitörlerinden Ink4 ailesinin bir üyesi olan p15'in sentezini artırarak hücre çoğalmasını hızlandırır. TGF-β sinyal yolunu etkileyen mutasyonlar da kolon kanseri gelişimininde, göreceli olarak, erken dönemlerde gerçekleşir ve sıklıkla adenomlarda görülür. Bazı tümörlerde mutasyonlar TGF-β reseptörünü kodlayan *TβRII* tümör baskılayıcı genini inaktive eder. Başka durumlarda ise mutasyon sonucunda TGF-β sinyallerinin hedefi olan Smad2 ve Smad4 transkripsiyon faktörlerini kodlayan tümör baskılayıcı genler inaktifleşir. Son olarak da tümör gelişiminin daha geç bir aşamasında p53 tümör baskılayıcı geni inaktive olur.

Bu yüzden, çok basamaklı barsak kanserinin gelişiminden hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen farklı sinyal ileti yolaklarını etkileyen, çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gende biriken hasar sorumludur. Onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde biriken hasarın, meme ve akciğer karsinomları gibi başka kanserlerin de gelişiminde benzer şekilde rol oynadığı düşünülmektedir. Kanser



Şekil 15.40 Barsak kanserinde genetik değişiklikler
APC'nin (Wnt sinyal yolunun bileşeni) inaktivasyonu, tümör gelişmesinde erken bir olaydır. Bu olay çoğalan bir hücre topluluğu oluşturur. Bazen bunun yerine (Wnt sinyal yolunda APC'den daha aşağıda yer alan) β-katenini kodlayan gende mutasyonlar gerçekleşir. Bunu izleyen adenom gelişimi (ERK sinyal yolunu aktifleştiren) *ras* ve *raf* genlerinde ve TGF-β sinyal yolunun bileşenlerini (TGF-β reseptörü, Smad2 ve Smad4) kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlara bağlıdır. *p53* mutasyonları tümör gelişiminin daha ileri aşamalarında ortaya çıkar.

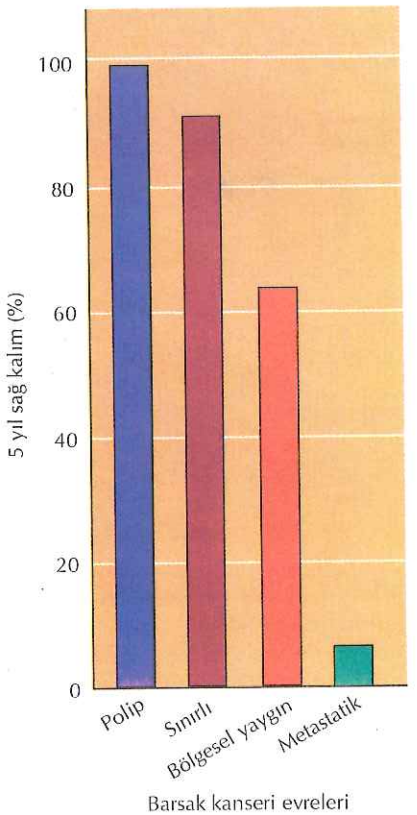
hücrelerinin tipik özelliği olan hücre çoğalmasının giderek kontrolden çıkmasının, normal koşullarda hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen, çok sayıda genin ürünlerinde ortaya çıkan anormalliklerin toplu sonucu olduğu kabul edilmektedir.

Moleküler Biyolojinin Kanserden Korunma ve Sağaltım Amacıyla Kullanılması

İnsan kanserlerinin gelişmesinden sorumlu moleküler nedenler konusunda bugünkü bilgimiz oldukça yeterlidir. Ancak, kanser bilimsel ilgi alanı olmanın ötesinde, her dört Amerikalı'dan birinin hayatını elinden alan korkutucu bir hastalıktır. Bu yüzden, hem günümüzde, hem de gelecekteki araştırmaların başlıca hedefi, kansere ilişkin giderek artan bilgimizin bu hastalıktan korunma ve sağaltım konusunda pratik gelişmelere dönüşmesidir. Kanserin moleküler biyolojisini aydınlatmaya yönelik gelişmeler kanserden korunma ve tedavi konusunda yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır.

Korunma ve Erken Tanı

Kanserle mücadelenin en etkili yolu hastalığın ortaya çıkmasını önlemektir. İkinci ve etkili bir başka alternatif de, tümör gelişimini daha malin şekle dönüşmeden önce, kolayca tedavi edilebileceği aşamada saptamaktır. Vücuda yayılıp metastaz yapmadan önce saptandığında, kanserlerin birçoğu ameliyat ya da radyasyon gibi lokal tedavi girişimleri ile iyileştirilebilir. Örneğin, barsak kanseri malinite öncesi erken aşamalarda (adenomlar), genellikle küçük sayılabilecek cerrahi girişimlerle tamamen iyileşir (Şekil 15.41). Oluştuğu bölgeden başka yere yayılmamış olan erken evre karsinomlarda da iyileşme oranı (%90) oldukça yüksektir. Buna karşılık kanser çevre dokulara ve lenf düğümlerine yayıldığında, sağ kalım oranı %50'lere, metastatik barsak kanserli hastalarda ise %10'lara kadar düşer. Bu yüzden erken tanı, sağ kalım açısından çok önemli bir faktördür.



Şekil 15.41 Kolon karsinomlu hastalarda sağ kalım oranları
Adenom (polip), henüz çevreye yayılmamış, sınırlı karsinom, komşu dokuya ve bölgesel lenf düğümlerine yayılmış karsinom ve uzak metastazları bulunan karsinom olguları için beş yıllık sağ kalım oranları

Moleküler biyolojinin, kanserden korunma ve erken tanı konusunda başlıca uygulama alanı, kalıtsal olarak kanser gelişmesine yatkınlık taşıyan bireylerin belirlenebilmesidir. Bu tür kalıtsal yatkınlık, tümör baskılayıcı genlerde, en az bir onkogende (ret), ya da, kalıtımsal polipsiz barsak kanserinin gelişmesine neden olan yanlış eşleşmelerin onarımından sorumlu genlerde (bkz. Bölüm 5, Moleküler Tıp) mutasyonlar sonucunda görülür. Bu genlerdeki mutasyonların genetik testlerle saptanmasıyla, yüksek riskli bireylerin, hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenmesi mümkün olur.

Yüksek riskli bireylerin yakından izlenmesi aile planlaması konusundaki kararları etkilediği gibi, bazı kanser türlerinin erken saptanmasına ve daha iyi tedavi edilmesine de olanak verir. Örneğin, barsaktaki adenomlar, kolonoskopi ile saptanarak malin şekle dönüşmeden önce çıkartılabilir. Ailesel adenomatöz polipozis'li (APC tümör baskılayıcı genindeki kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanan) hastalarda, yaşamlarının ilk yirmi yılı içinde, yüzlerce polip gelişir. Bu yüzden bu hastalarda poliplerden bazıları kaçınılmaz biçimde kansere dönüşmeden önce bütün barsak çıkartılır. Buna karşılık kalıtımsal polipsiz barsak kanserli hastalarda, daha az sayıda polip görülür ve bunlar daha ileri yaşlarda ortaya çıktığından rutin kolonoskopi ve barsak kanseri gelişimini engelleyen steroid olmayan anti-yangısal (NSAID) ilaç uygulamaları gibi girişimler yararlı olur.

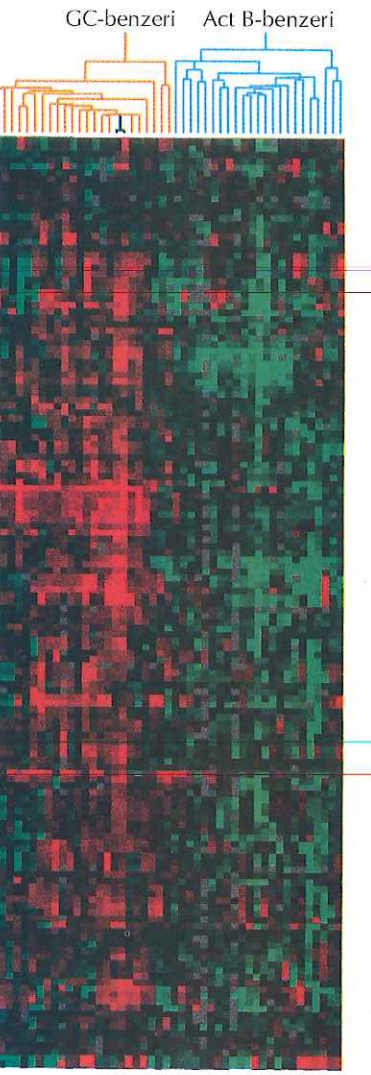
Bilinen genlerdeki bozuklukların neden olduğu kanserlerin doğrudan kalıtılması, kanser olgularının ancak %5'ini oluşturan ender bir olaylardır. En sık görülen kalıtsal kanser sendromu, barsak kanserlerinin %15'ini ve ABD'de görülen tüm kanserlerin %1-2'sini oluşturan, kalıtımsal polipsiz barsak kanseridir. BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonlar da, oldukça sık görülür ve tüm meme kanserlerinin %5-10'unu oluşturur. Diğer yandan meme, barsak ve akciğer kanseri gibi, sık görülen erişkin kanserlerinin önemli bir bölümü, henüz bilinmeyen bazı genlerdeki mutasyonlara bağlı olabilir. Bu yüzden, yeni, kansere yatkınlık genlerinin izolasyonu klinik uygulamaları etkileyen önemli bir konudur. Bu tür yatkınlık genlerine sahip olan bireyler kendilerine zarar verebilecek karsinojen maddelerden (örn., akciğer kanserinde sigara içimi) sakınmaları konusunda uyarılabilir ve tümörlerin kolayca tedavi edilebildiği erken evrede saptanabilmesi için yakından izlenebilir. Kansere yatkınlık taşıyan bireylerin, doğru önleyici yaklaşımlar ve erken tanı önlemleri ile güvenilir biçimde belirlenmesi, kanser ölümlerini önemli ölçüde etkileyebilir.

Moleküler Tanı

Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin moleküler analizi, belirli tümör tiplerinde kanserin tanısı ve tedavinin etkisini izlemek açısından yararlı bilgiler verebilir. Bu türden birçok değişik moleküler tanı uygulamaları artık uygulamaya girmektedir. Onkogenlerdeki mutasyonlar tedavi sırasında hastalığın durumunu izlemek için yararlı birer moleküler belirteç olabilir. Kronik miyeloid lösemide *abl* translokasyonu buna güzel bir örnektir. Bu translokasyon daha önce de belirtildiği gibi, *abl* geninin *bcr* ile birleşmesi ve onkojenik Bcr/Abl proteininin ekspresyonu ile sonuçlanır (bkz. Şekil 15.25). Lösemili hücrelerde bcr/abl geninin duyarlı bir biçimde saptanmasına olanak veren polimeraz zincir reaksiyonu (bkz. Şekil 3.24), bu hastalarda tedaviye cevabı izlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Belirli onkogen veya tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların saptanması, bazı durumlarda, farklı tedavi yaklaşımları arasında seçim yapmayı kolaylaştırır. Örneğin, nöroblastomlarda N-*myc*, meme ve over kanserinde *erb*B-2 genlerinin amplifikasyonu, hastalığın hızlı ilerlediğini gösterir. Bu yüzden, amplifikasyon görülen hastalara daha ağır tedavi verilmesi yerinde olabilir.

Kanserde herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ekspresyonunun genel analizi de tanı açısından önemli bilgi sağlayabilir. DNA mikrodizinlerinin kullanımı, onbinlerce genin aynı anda incelenmesine olanak verir (bkz. Şekil 3.27). Farklı tümörlerin gen ekspresyon profillerini kıyaslamak suretiyle, moleküler bir sınıflama yöntemi geliştirmek mümkündür. Bu tür çalışmalar, gen ekspresyon profillerinin, başka bakımlardan benzerlik gösteren tümörleri birbirinden ayırabildiğini ve hastalığın klinik seyri ya da tedaviye cevabı açısından bilgi verdiğini göstermektedir. Örneğin, yaygın büyük B hücreli lenfomanın, bilinen tedavi yöntemlerine birbirinden çok farklı tepki veren iki değişik tipi, gen ekspresyon analizi ile ayrılabilir. Yaygın büyük B hücreli lenfomalı hastaların yaklaşık %40'ı tedaviye olumlu yanıt verirken, geri kalan hastaların prognozu oldukça kötüdür. Gen ekspresyon profili analizleri, yaygın büyük B hücreli lenfoma olgularının, normal B hücrelerinin gelişiminin farklı aşamalarını simgeleyen ekspresyon profilleriyle, iki



Şekil 15.42 Yaygın büyük B hücreli lenfomada gen ekspresyon profili
Yaygın büyük B hücreli lenfoma hastaları, gen profillerine göre, germinal merkezli B hücre benzeri (GC-benzeri) ve aktif B hücresi benzeri (Act B-benzeri) olmak üzere iki alt tipe ayrılır. Her lenfoma türüne özgü floresan problar mikrodizin üzerindeki cDNA klonlarından oluşan dizilerle hibridleştirilir. Her sıra başka cDNA klonuna aittir. Her sütun ise başka bir lenfoma örneğinden elde edilen mRNA ile hazırlanmış probu simgeler. Sonuçlar, hibridleşen floresan probun referans prob ile kıyaslanmasıyla elde edilir. Kırmızı, daha çok lenfoma probunun hibridleşerek daha şiddetli sinyal verdiğini gösterir. Germinal merkezli B hücre benzeri lenfomalar, B hücrelerinin gelişmesinde daha erken bir evreyi temsil eder. (A.Alizadeh et al., 2000, *Nature* 403:503)

gruba ayrılabildiğini göstermiştir (Şekil 15.42). Gen ekspresyon profili, B hücrelerinin gelişiminde erken aşamayı simgeleyen hastalarda prognozun belirgin biçimde daha iyi olduğunun saptanması, lenfomalarda gen ekspresyon profillerine göre yapılan sınıflamanın prognoz açısından değer taşıdığını ortaya koymuştur. Meme, akciğer ve prostat kanserleri dahil, daha başka kanser türlerinde de benzer gen ekspresyon profili uygulamaları, tümörlerin alt tipleri ile klinik davranışları açısından değerli bilgiler vermektedir.

Sağaltım

Günümüzde en önemli sorunlardan biri, onkogen ve tümör baskılayıcı genler konusundaki bilgilerin, kanser hücresini doğrudan hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olup olmayacağıdır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların çoğu, ya DNA hasarına neden olan, ya da DNA'nın replikasyonunu engelleyen maddelerdir. Bu yüzden, söz konusu ilaçlar sadece kanser hücreleri için değil, normal hücreler ve özellikle kök hücrelerin hızlı bölünmesiyle yenilenen (hematopoyetik hücreler, mide-barsak sistemi epitel hücreleri ve saç follikül hücreleri gibi) hücreler için de toksiktir. Kansere karşı geliştirilen ilaçların normal hücreler üzerindeki bu etkisi, ilaçlara bağlı toksisiteyi belirler ve bu ilaçların kanser tedavisinde etkin biçimde kullanımını kısıtlar.

Anjiyogenezi (yeni damar oluşumunu) engelleyerek tümörün büyümesini durduran maddeler de kanser tedavisinde ümit veren yeni bir yaklaşım oluşturmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi, tümörün gelişmesi için gerekli olan oksijenin ve besin maddelerinin sağlanması yeni damarların oluşumuna bağlıdır. Bu yüzden anjiyogenez tümör gelişimi açısından kritik önem taşır. Tümör hücreleri, damar endotel hücreleri çoğalmaya uyararak tümörün içinde yeni kapilerler oluşmasını sağlayan çok sayıda büyüme faktörü salgılar. Anjiyogenezin önemi, 1971 yılında Judah Folkman tarafından ilk kez farkedilmiş, Folkman ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmalar, endotel hücrelerinin çoğalmasını durdurarak anjiyogenezi engelleyen yeni maddelerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu maddeler, özellikle, yeni damarların oluşumunu engellediğinden, normal hücreler için diğer antikanser ilaçlar kadar toksik değildir. Hayvan deneylerinde ümit verici sonuçlar veren anjiyogenez inhibitörlerinin, insan kanserlerindeki etkinliği klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir.

Selektif kanser tedavisi yönünden bir başka strateji de, tümör gelişimini hızlandıran onkogenleri doğrudan hedef alan maddelerdir. Ne yazık ki, kanser tedavisi açısından onkogenler sadece tümör hücresine özgü değildir. Protoonkogenler normal hücrelerde önemli işlevler üstlendiğinden, onkogenlerin ekspresyonunu ya da işlevini engelleyen maddeler tümör hücrelerini olduğu kadar normal hücreleri de etkiler. Bu yüzden onkogenlerin, antikanser maddelerin hedefi olarak değerlendirilmesi çok kolay değildir. Gene de, bu alandaki çok sayıda ümit verici gelişme, onkogenleri temel alan seçici tedaviler geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

Belirli bir onkogene karşı ilk tedavi girişimi, akut promiyelositer lösemide uygulanmıştır. Bu lösemi türüne neden olan translokasyonda, retinoik asit reseptörünü (*RARα*) kodlayan gen bir başka gen ile (*PML*) birleşerek *PML/RARα* onkogenini oluşturur. PML/RARα proteininin bir özelliği de, hücre farklılaşmasını engellemesidir. Ancak, tedavi amacıyla yüksek doz retinoik asit verildiği takdirde lösemili hücreler yeniden farklılaşabilirler. Bu da, retinoik asidin, PML/RARα'nın

MOLEKÜLER TIP

STI-571: brc/abl Onkogenini Hedef Alan Kanser Tedavisi

Hastalık

Kronik miyeloid lösemi (KML) erişkinlerde görülen lösemilerin yaklaşık %20'sini oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2003 yılında yaklaşık 4,300 yeni lösemi olgusunun görüleceği ve 1,700 kişinin de bu hastalık nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir.

KML pluripotent kemik hücrelerinden köken alır. Yavaş ilerleyen bu hastalığın klinikte iki aşaması vardır: kronik faz ve blast krizi. KML'nin kronik fazı çok az belirti gösterir ve yıllarca sürebilir. Ancak, sonunda bütün hastalar, blast krizi adı verilen ve yaşamı tehdit eden akut faza girerler. Blast krizinin tipik özelliği, hızla çoğalan çok sayıda lösemi hücresinin (blast) birikmesidir. Blast krizindeki hastalar, alışılmış kimsayal sağaltıcı ilaçlar ile tedavi edilir. Kemoterapi hastalığın kronik fazında hafifleme sağlayabilir ancak, genellikle lösemi hücrelerini ortadan kaldırmak için yeterli olmaz. KML kemik iliği kök hücrelerinin transplantasyonu ile de tedavi edilebilir. Kronik fazdaki hastaların yarısı bu işlem sonucunda tamamen iyileşir.

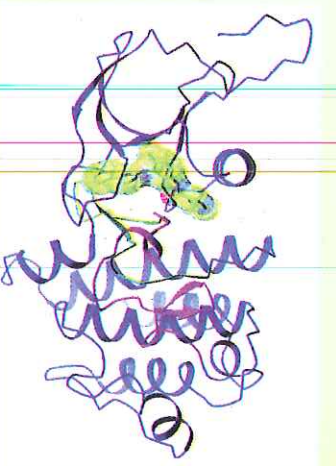
Moleküler ve Hücresel Temel

Kormozom 9 üzerindeki *abl* onkogeninin normal lokusundan 22. kromozoma translokasyonu sonucunda aktivasyonu bu lösemilerin %95'inde görülen KML'de yaygın bir olaydır. Bu translokasyon, *abl* ile 22. kromozomdaki *bcr* genlerini birleştirerek *bcr/abl* onkogeninin oluşmasına neden olur. Onkogen tarafından sentezlenen Bcr/Abl birleşik proteininde Abl'nin birinci eksonunun yerini Bcr'a özgü amino asit dizileri almıştır (bkz. Şekil 15.25). Bcr/Abl proteini, sürekli aktif durumda kalan bir tirozin kinazdır ve hücre içi sinyal yollarını aktifleştirerek lösemi gelişmesine neden olur.

KML'de bcr/abl onkogeninin aktivasyonu, çok yaygın olduğundan bu molekülün klinikte yararlı olabilecek selektif bir tirozin kinaz inhibitörü geliştirilmesi açısından uygun bir hedef olduğu düşünülmüştür. Bu doğrultudaki çalışmalar, bir onkogen proteinine karşı ilk selektif inhibitör ve ilk başarılı ilaç olan STI-571, ya da Gleevec'in geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır.

Önlem ve Tedavi

STI-571'in geliştirilmesi, 2-fenil-aminopirimidinin özgül olmayan bir protein kinaz inhibitörü olarak etki ettiğinin farkedilmesiyle başlamıştır. Daha sonra, Abl tirozin kinaz da dahil, farklı hedeflere karşı çok sayıda benzer madde sentezlenmiş, bu maddelerin etkileri incelenirken, STI-571'in Abl'ye ve iki başka tirozin kinaza (PDGF reseptörü ve c-Kit) karşı güçlü, spesifik inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar, STI-571'in gerek kültürde *bcr/abl* onkogeni ile transforme edilen, gerekse KML'li hastalardan izole edilen hücrelerin çoğalmasını durdurduğunu göstermiştir. STI-571 ayrıca *bcr/abl* ile transforme edilen hücrelerin farede tümör oluşturmasını da engellemektedir. Buna karşılık, normal hücreler ve başka onkogenler ile transforme edilen hücreler STI-571'den etkilenmez. Bu bulgular STI-571'in spesifik olarak Bcr/Abl proteinini hedef aldığını gösterir.



STI-571'in bir türevi ile birleşen Abl katalitik bölgesinin kristal yapısı T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson and J. Kuriyan. 2000. Science 289: 1938.)

Bu sonuçlar doğrultusunda STI-571 için, 1998 yılının Temmuz ayında başlatılan Faz I klinik çalışma çok başarılı sonuç vermiş, tedavi edilen kronik fazdaki 54 hastadan 53'ü tedaviye cevap verdiği gibi, ilaç verilen blast krizindeki hastaların yarısından çoğunda da cevap alınmıştır. İlk araştırmadan elde edilen bu başarılı sonuç 1,000 den fazla hastayı kapsayan Faz II çalışmanın başlatılmasına yol açmış, bu sefer kronik fazdaki hastaların %95'inde ve blast krizindeki hastaların yaklaşık %50'sinde alınan umut verici sonuçlar, ilk bulguları doğrulamıştır. Üstelik diğer kemoterapötik ilaçlara kıyasla STI-571'in yan etkisi son derece azdır. Bu klinik araştırmalar STI-571'in KML tedavisinde son derece etkili bir tedavi olduğunu göstermiş ve ilacın Mayıs 2001'de FDA tarafında hızlandırılmış onay almasıyla sonuçlanmıştır. Bu olay temel araştırmaların klinik uygulamaya girmesi açısından bir dönüm noktasıdır.

Referans:

Druker, B.J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21:8541-8546.

inhibitör etkisini baskılayabildiğini göstermektedir. Retinoik asit tedavisi ile birçok hastada hafifleme dönemi sağlanır, ancak bu etki genellikle devamlı olmaz ve sonunda hastalık yeniden nükseder. Buna karşılık, retinoik asit ile standart, kimyasal sağaltıcı ilaçların birlikte kullanılması hastalığın nüksetme oranını önemli ölçüde azaltır. Bu yüzden akut promiyelösiter lösemi tedavisinde retinoik asit kullanımı belirgin yarar sağlar. Retinoik asidin tedavideki olumlu etkisi, *PML/RARα* onkogeninin bulunmasından önce saptanmış ve bu proteini eksprese eden lösemili hücrelere karşı etkisi ise, bilinçli ilaç geliştirme çalışmalarıyla değil, şans eseri keşfedilmiştir. Gene de, retinoik asidin akut promiyelositer lösemi tedavisinde kullanımı, bir onkogen proteinini hedef alan ilaçların klinikteki yararına ilk örnektir.

ErbB-2 proteinine yönelik bir monoklonal antikor olan Herceptin, kanser tedavisinde belirli bir onkogene karşı geliştirilen ve klinik kullanım için FDA onayı alan ilk ilaçtır. *erb*B-2 geninin amplifikasyonu sonucunda, meme kanserlerinin %30 kadarında, erbB-2 proteini aşırı eksprese olur. ErbB-2 aşırı ekspresyonu görülen hücrelerde, ErbB-2'nin (reseptör tirozin kinaz) hücre dışı bölgesini tanıyan bir antikorun, tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Herceptin'in geliştirilmesini sağlamış, yapılan klinik testler, tümörlerinde ErbB-2 aşırı ekspresyonu görülen metastatik meme kanserli 600 den fazla hastada Herceptin'in tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı ve hastaların ömrünü uzattığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda Herceptin, 1998 yılında yüksek ErbB-2 ekspresyonu gösteren metastatik meme kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır.

İlaç geliştirme açısından daha geniş bir uygulama alanı da, onkogen proteinlerini inhibe eden küçük moleküllerdir. Kanser hücrelerinin çoğalması ve sağ kalımını düzenleyen sinyal yollarında önemli rol oynayan protein kinazlar, bu grupta yer alırlar. Bu alandaki en heyecan verici yeniliklerden biri, kronik miyeloid lösemide Philadelphia kromozomuna özgü translokasyon sonucu ortaya çıkan (bkz. Şekil 15.25), Bcr/Abl protein-tirozin kinaza karşı geliştirilen selektif bir inhibitördür. Brian Druker ve arkadaşları tarafından, Bcr/Abl protein kinaza karşı geliştirilen güçlü ve spesifik bir inhibitörün (STI-571 ya da Gleevec), kronik miyeloid lösemi hücrelerinin çoğalmasını etkili biçimde durdurduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar üzerine, 1998 yılında STI-571 in etkisini araştıran bir klinik çalışma başlatılmış, STI-571 ile çok az yan etkiye karşılık dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. STI-571 ile elde edilen bu çarpıcı başarı, 2001 yılının Mayıs ayında ilacın FDA tarafından kronik miyeloid lösemi tedavisi için onaylanmasını sağlamıştır. Bazı hastalarda ilaca karşı direnç gelişmekle birlikte, STI-571 bu lösemi türü için çok etkili bir tedavidir. Özel olarak hazırlanmış ilk spesifik onkogen inhibitörü olarak, bu buluş temel bilim araştırmalarının kanser tedavisine uygulanması konusunda bir dönüm noktasıdır.

STI-571 örneği, onkogen ve tümör baskılayıcı genleri hedef alan ilaç geliştirme çalışmalarının, kanser hücrelerini seçici biçimde etkileyen yeni nesil ilaçlar geliştirme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Ras proteinlerini hedef alan ilaçların geliştirilmesi de, insan tümörlerinde *ras* onkogeninin önemine uygun şekilde, yoğun biçimde araştırılan bir konudur. Ras proteinleri, hücre zarına karboksi uçlarına eklenen bir farnezil izopirenoid yardımıyla taşınır (bkz. Şekil 7.32). Bu modifikasyon türü, proteinlerde oldukça ender

görüldüğünden, farnezillenme inhibitörlerinin ilaç olarak kullanımı araştırılmakta ve insan kanserlerinin tedavisindeki potansiyel klinik kullanımları değerlendirilmektedir. Olası antikanser ilaçlar olarak, EGF reseptörü, Raf, MEK, Akt gibi protein kinaz inhibitörleri ile PI 3-kinaz inhibitörlerini de içeren çok sayıda protein kinaz inhibitörü geliştirilmektedir. PI 3-kinaz ve Akt inhibitörlerine ek olarak, kanser hücresinin apoptoza karşı duyarlığını artıran maddeler ile, mutant p53 proteinine bağlanarak onu yeniden aktifleştiren ilaçlar da denenmektedir. Moleküler biyolojinin kanser tedavisindeki etkisi ve rolü hakkında değerlendirme yapabilmek için daha uzun zaman geçmesi gerekmekle birlikte, onkogenler ile tümör baskılayıcı genlerin ürünlerini hedef alan ilaç tasarımının bu konuda önemli bir rol oynayacağı kesindir.

ÖZET

KANSERİN GELİŞİMİ VE NEDENLERİ

Kanser Türleri: Kanser herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkabilir. Hasta için en önemli olan konu, oluştukları bölgede sınırlı kalan selim tümörler ile normal dokulara ve bütün vücuda yayılan malin tümörlerin ayırımıdır.

Kanserin Gelişmesi: Tümörler, bir değişiklik nedeniyle anormal çoğalmaya başlayan bir tek hücreden gelişir. Gerçekleşen yeni mutasyonlar giderek, daha hızlı çoğalma, invazyon, sağ kalım ve metastaz yeteneğine sahip hücrelerin ortaya çıkmasına olanak verir.

Kanserin Nedenleri: Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen DNA hasarı yaratarak, mutasyonlara neden olurlar. Bazı başka karsinojenler ise hücre çoğalmasını uyararak, kanser gelişimine katkıda bulunur. Viruslar da insan ve başka canlılarda kansere neden olabilir.

Kanser Hücresinin Özellikleri: Kanser hücresinin denetimsiz çoğalması hücre dışı büyüme faktörlerine gereksinimin azalması ve kontakt inhibisyonun kaybı gibi özelliklerine yansır. Birçok kanser hücresi, *in vivo* koşullarda sürekli çoğalmalarıyla uyumlu olarak, farklılaşma açısından da kusurludur. Kanser hücrelerinin apoptoza girmeme konusundaki karakteristik özelliği tümör gelişimine önemli katkıda bulunur.

Kültürde Hücre Transformasyonu:Hücre transformasyonunu gösteren *in vitro* testlerin geliştirilmesi, kültür ortamında normal hücrelerin tümör hücresine dönüşmesini izleme olanağı vermiştir.

TÜMÖR VİRUSLARI

Hepatit B ve C Virusları: Hepatit B ve C virusları insanda karaciğer kanserine neden olur.

SV40 ve Polyomavirusu: Ne SV40, ne de polyomavirusu insanda kanser yapmadıkları halde, bu viruslar hücre transformasyonunun moleküler biyolojisini incelemek için model sistemler oluştururlar. SV40 Büyük T antijeni hücrede tümör baskılayıcı Rb ve p53 proteinleri ile etkileşerek transformasyona neden olur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

karser, tümör, selim tümör, malin tümör, metastaz, karsinom, sarkom, lösemi, lenfoma

tümör başlangıcı, tümörün ilerlemesi, adenom, polip

karsinojen, tümör kamçılayıcı

yoğunluğa-bağlı inhibisyon, otokrin çoğalma uyarımı, kontakt inhibisyon, anjiyogenez, programlı hücre ölümü, apoptoz

hücre transformasyonu

tümör virusu, hepatit B virusu, hepatit C virusu

simian virus 40 (SV40) polyomavirus

papillomavirus

Papillomaviruslar: Papillomaviruslar, insanda serviks kanseri de dahil, birçok değişik canlıda tümör oluşturur. SV40 Büyük T antijeni gibi, papillomavirusların transformasyona yol açan proteinleri de Rb ve p53 ile etkileşir.

adenovirus

Adenoviruslar: Adenoviruslar, insanda veya diğer canlılarda doğal tümörlere neden olmamakla birlikte, kanser araştırmalarında önemli model oluştururlar. Bunların transformasyona neden olan proteinleri de Rb ve p53 ile etkileşir.

herpesvirus, Kaposi sarkomu-ilişkili herpes virus, Epstein-Barrvirusu,

Herpesviruslar: En karmaşık hayvan viruslarından olan herpesviruslar insan dahil birçok canlıda kanser yapabilir.

retrovirus, Rous sarkom virusu (RSV)

Retroviruslar: Retroviruslar de insanda ve başka canlılarda kansere neden olabilir. Bazı retroviruslar hücre transformasyonuna yol açan belirli genlere sahiptir. Çok onkogenik olan bu retrovirusların araştırılması viral ve hücresel onkogenlerin tanımlanmasını sağlamıştır.

ONKOGENLER

onkogen, src, ras raf

Retroviral Onkogenler: Tanımlanan ilk onkogen, RSV'nun *src* genidir. Daha sonraki araştırmalarda farklı retroviruslara ait iki düzineden fazla değişik onkogen tanımlanmıştır.

protoonkogen

Protoonkogenler: Retroviral onkogenler kendilerine çok benzeyen, protoonkogen adı verilen, normal hücre genlerinden türemiştir. Onkogenler ilgili protoonkogenin mutasyon geçirmiş, anormal çoğalan şekilleridir.

ras, c-myc, abl N-myc, erbB-2

İnsan Kanserlerinde Onkogenler: Onkogenlerin birçoğu, nokta mutasyonu, DNA yeniden düzenlenmeleri ve gen amplifikasyonu yoluyla aktifleşirler. Bunların bazıları, örneğin, *ras* genleri ilk kez retroviruslarda tanımlanan onkogenlerin hücresel eşleniğidir.

Fos, Jun, D1, ErbA, PML/RARα, PI3-kinaz, Akt, Bcl-2

Onkogen Ürünlerinin İşlevi: Onkogen proteinlerinin çoğu hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarında görev yaparlar. Siklin D1'i kodlayan gen de hücre çoğalmasını uyaran olası bir onkogendir. Bazı onkogen proteinleri hücrenin farklılaşmasını engellerken PI 3-kinaz, Akt ve Bcl-2 de apoptozu engeller.

TÜMÖR BASKILAYICI GENLER

tümör baskılayıcı gen, Rb, p53

Tümör Baskılayıcı Genlerin Tanımlanması: Onkogenlerin aksine, tümör baskılayıcı genler, tümörün gelişmesini durdurur. Bu genlerin tipik örneği olan Rb geni, retinoblastom kalıtımını inceleyen çalışmalarla saptanmıştır. Rb'nin veya p53 gibi başka bir tümör baskılayıcı genin kaybı ya da hasara uğraması birçok insan kanserinin gelişmesini hızlandırabilir.

PTEN

Tümör Baskılayıcı Gen Ürünlerinin İşlevi: Tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinlerin çoğu hücrenin çoğalmasını veya sağ kalımını baskılar. Rb, INK4 ve p53 hücre çoğalmasını negatif yönde etkileyen düzenleyici proteinlerdir. P53 ayrıca, DNA hasarı veya başka uyaranların etkisiyle programlı hücre ölümünün gerçekleşmesi için de gereklidir. Bu yüzden p53'ün inaktivasyonu tümör hücrelerinin sağ kalımını artırır.

Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Genlerin Tümör Gelişiminde Rolü: İnsan kanserleri gerek onkogenlerde, gerekse tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar nedeniyle gelişebilir. Bu türden çok sayıda gende biriken hasarın, hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı açısından kanser hücresine özgü değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir.

MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN KANSERDEN KORUNMADA VE KANSER TEDAVİSİNDE YERİ

Korunma ve Erken Tanı: Kanserlerin çoğu, tümör gelişiminin erken aşamalarında saptandığı takdirde, tedavi edilebilir. Genetik testlerle, kansere yatkınlık gösteren bireylerin belirlenmesi, erken tanı şansı verdiği gibi riskli hastaların daha etkili biçimde tedavi edilmesine de olanak sağlayabilir.

Moleküler Tanı: Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde saptanan mutasyonlar, tanıda ve tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılabilir. Gen ekspresyonu analizi de kanserin klinik seyri hakkında bilgi verebilir ve prognozu birbirinden farklı alt grupların ayırt edilmesini sağlayabilir.

Tedavi: Belirli onkogen ve tümör baskılayıcı genlere karşı geliştirilen ilaçlar, sadece kanser hücrelerine etki eden, yeni tedavi yollarının bulunmasını sağlamaktadır.

Sorular

1. Kanser nedir? Hangi yönleriyle selim tümörden farklıdır?

2. Kanser gelişiminde klonal seçimin rolü nedir?

3. Östrojenler kanser riskini neden arttırır?

4. Otokrin büyüme faktörü uyarısı neden tehlikelidir?

5. Adenoviruslar, papillomaviruslar ve SV40 hepsi transformasyonu aynı gen ya da gen ürünlerini etkileyerek uyarırlar. Bu ürünler hangileridir?

6. Rb'ye bağlanamadığı için hücrede transformasyona neden olamayan mutant bir SV40 T antijeni elde ettiğinizi düşünün. Bu mutant T antijeni hücreye E7 yi kodlayan papillomavirus cDNA'sı ile birlikte verildiğinde transformasyona neden olur mu? Aynı şey E6 ile yapılırsa ne olur?

7. cAMP genel olarak fibroblastların çoğalmasını baskılar. Bu hücrelerde *gsp* onkogen olarak etki eder mi?

8. Bir protoonkogen protein kodlayan bölgesinde değişiklik ya da mutasyon olmadan onkogene nasıl dönüşür? Bunun için iki farklı yol söyleyiniz.

9. Rb nin mutasyon ile inaktive olduğu tümör hücrelerinde, INK4 tümör baskılayıcı gen ürününün aşırı ekspresyonunun etkisi ne olur?

10. Radyasyon tedavisine karşı p53 geni normal olan tümörler mi, yoksa mutant p53 taşıyan tümörler mi daha duyarlıdır?

11. Retinoblastoma yatkınlık dominant bir karakter olarak kalıtıldığı halde, bu dominant karakteri taşıyan çocuklarda neden tüm retina hücrelerinde tümör gelişmez?

12. Belirli bir onkogen ürününe karşı özel olarak geliştirilen ilk inhibitör olan STI-571 nasıl etki eder?

Kaynaklar ve Ayrıca Okunacaklar

Genel Kaynaklar

Cooper, G. M. 1992. *Elements of Human Cancer.* Boston: Jones and Bartlett.

Cooper, G. M. 1995. *Oncogenes.* 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett.

Varmus, H. and R. A. Weinberg. 1993. *Genes and the Biology of Cancer.* New York: Scientific American Library.

Kanserin Gelişimi ve Nedenleri

Chambers, A. R, A. C. Groom and I. C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer* 2:563-572. [R]

Christofori, G. and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24: 73-76. [R]

Fialkow, P. J. 1979. Clonal origin of human tumors. *Ann. Rev. Med.* 30:135-143. [R]

Hanahan, D. and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364. [R]

Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70. [R]

Henderson, B. E., R. Ross and L. Bernstein. 1988. Estrogens as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 48:246-253. [R]

Liotta, L. A. and E. C. Kohn. 2001. The micro-environment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379. [R]

Nowell, P. C. 1986. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46: 2203-2207. [R]

Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411:390-395. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400. [R]

Sawyers, C. L., C. T. Denny and O. N. Witte. 1991. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 64: 337-350. [R]

Sporn, M. B. and A. B. Roberts. 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Science* 313:745-747. [R]

Temin, H. M. and H. Rubin. 1958. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in culture. *Virology* 6:669-688.[P]

Tenen, D. G. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Rev. Cancer* 3: 89-101. [R]

Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462. [R]

Writing Group for the VVomen's Health Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post-menopausal women. *J. Amer. Med. Assoc.* 288:321-333. [P]

Tümör Virusları

Bishop, G. A. and L. K. Busch. 2002. Molecular mechanisms of B-lymphocyte transformation by Epstein-Barr virüs. *Microbes and Infection* 4: 853-857. [R]

Blumberg, B. S. 1997. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4:7121-7125. [R]

Boshoff, C. and R. Weiss, 2002. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373-382. [R]

Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus, eds. 1997. *Retroviruses.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman and S. E. Straus, eds. 1996. *Fundamental Virology.* 3rd ed. New York: Lippincott-Raven.

Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 1999. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* Washington, DC: ASM Press.

Giannini, C. and C. Brechot. 2002. Hepatitis C virüs biology. *Cell Death Diff.* 10: S27-S38. [R]

Helt, A.-M. and D. A. Galloway. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus onco-proteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 24:159-169. [R]

Jenner, R. G. and C. Boshoff. 2002. The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim. Biophys. Acta* 1602:1-22.[R]

Lam, N. and B. Sugden. 2002. CD40 and its viral mimic, LMP1: Similar means to different ends. *Cell. Signalling* 15:9-16. [R]

Mortreux, F., A.-S. Gabet and E. Wattel. 2003. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis *in vivo. Leukemia* 17: 26-38. [R]

Saenz-Robles, M. T., C. S. Sullivan and J. M. Pipas. 2001. Transforming functions of simian virüs 40. *Oncogene* 20: 7899-7907. [R]

Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer* 2: 342-350. [R]

Onkogenler

Aaronson, S. A. 1991. Growth factors and cancer. *Science* 254:1146-1153. [R]

Adams, J. M. and S. Cory. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26: 61-66. [R]

Blume-Jensen, P. and T. Hunter. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411:355-365. [R]

Bos, J. L. 1989. Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* 49:4682-4689. [R]

Datta, S. R., Brunet, A. and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Devel.* 13: 2905-2927. [R]

Davies, H. and 51 others. 2002. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 417:949-954. [P]

Der, C. J., T. G. Krontiris and G. M. Cooper. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3637-3640. [P]

Krontiris, T. G. and G. M. Cooper. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1181-1184. [P]

Leder, P., J. Battey, G. Lenoir, C. Moulding, W. Murphy, H. Potter, T. Stewart and R. Taub. 1983. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771. [R]

Legauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649. [R]

Look, A. T. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059-1064. [R]

Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227:1021-1023. [P]

Melnick, A. and J. D. Licht. 1999. Deconstructing a disease: RARα:, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215. [R]

Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and V. E. Velescu. 2002. *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934. [P]

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677. [R]

Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 300: 539-542. [P]

Solomon, E., J. Borrow and A. D. Goddard. 1991. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254:1153-1160. [R]

Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173. [P]

Sugden, B. 1993. How some retroviruses got their oncogenes. *Trends Biochem. Sci.* 18: 233-235. [R]

Tabin, C.J., S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy and E. H. Chang. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149. [P]

Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]

Testa, J. R. and A. Bellacosa. 2001. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10983-10985. [R]

Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462. [R]

Vivanco, I. and C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer* 2:489-501. [R]

Vogt, P. K. 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology* 46: 939-946. [P]

Tümör Baskılayıcı Genler

Bienz, M. and H. Clevers. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320. [R]

Cantley, L. C. and B. G. Neel. 1999. New insights into tumor suppression: *PTEN* suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4240-4245. [R]

Classon, M. and E. Harlow. 2002. The retinobiastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Rev. Cancer* 2:910-917. [R]

Fearon, E. R. 1997. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278:1043-1050. [R]

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646. [P]

Harris, H., O. J. Miller, G. Klein, P. Worst and T. Tachibana. 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223: 363-368. [P]

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170. [R]

Knudson, A. G. 1976. Mutation and cancer: A statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:820-823. [P]

Lee, W.-H., R. Bookstein, F. Hong, L.-J. Young, J.-Y. Shew and E. Y.-H. P. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science* 235:1394-1399. [P]

Massague, J., S. W. Blain and R. S. Lo. 2000. TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309. [R]

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677. [R]

Taipale, J. and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 411: 349-354. [R]

Venkitaraman, A. R. 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171-182. [R]

Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine. 2000. Surfing the *p53* network. *Nature* 408: 307-310. [R]

Yu, J., Z. Wang, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and L. Zhang. 2003. *PUMA* mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. [P]

Kanser Biyolojisi ve Kanser Tedavisinde Moleküler Biyoloji Uygulamaları

Alizadeh, A. A. and 31 others. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-511. [P]

Balmain, A. 2002. Cancer as a complex genetic trait: Tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell* 108: 145-152. [R]

Dancey, J. and E. A. Sausville. 2003. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature Rev. Drug Discovery* 2:296-313. [R]

Degos, L., H. Dombret, C. Chomienne, M.-T. Daniel, J.-M. Miclea, C. Chastang, S. Castaigne and P. Fenaux. 1995. All-*trans*-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85:2643-2653. [R]

Downward, J. 2002. Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 3:11-22. [R]

Druker, B. J. 2002. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546. [R]

Hampton, G. M. and H. F. Frierson, Jr. 2003. Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol. Med.* 9: 5-10. [R]

Harries, M. and I. Smith. 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-Related Cancer* 9: 75-85. [R]

Kerbel, R. and J. Folkman. 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Rev. Cancer* 1:727-739. [R]

Oliff, A. 1999. Farnesyltransferase inhibitors: Targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1423: C19-C30. [R]

Perera, F. P. 1997. Environment and cancer: Who are susceptible? *Science* 278: 1068-1073. [R]

Ponder, B. 2001. Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341.[R]

Thun, M. J., S. J. Henley and C. Patrono. 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:252-266. [R]

Sorulara Yanıtlar

Bölüm 1

1. a) Genetik materyal olarak DNA kullanırlar.
   b) Bir plazma zarıyla çevrilidirler.
   c) Enerji üretimi için aynı temel mekanizmaları kullanırlar.
   d) Proteinleri benzer yolla sentezlemek için hepsi ribozomları kullanır.

3. Nükleik asitler.

5. Çünkü, makro molekülleri paket olarak koruyabilen, bağımsız (münferit) bir birim oluşturur, kendi kendine çoğaltabilir ve birim olarak evrimleşebilir.

7. Havanın kırma indeksi 1.0; yağın kırma indeksi yaklaşık olarak 1.4 dür. Çözünürlük = $0.61\lambda / \eta \sin \alpha$ (η kırma indeksidir) olduğuna göre, bir örneğin yağ yerine hava içerisinden gözlenmesi, çözünürlük limitini 0.2 μm den 0.3 μm ye değiştirir.

9. Hız santirfügasyonu organelleri büyüklük ve biçim esasına göre ayırırken, denge santirfügasyonu yoğunluk esasına göre ayırır (büyüklük ve biçimden bağımsızdır).

11. Bu hücreler, erişkindeki her türlü farklı hücre tipine farklılaşabilme özelliklerini korurlar ve böylece, tedavi amacıyla, hastalıklı hücrelerin yerine geçme potansiyeli sunarlar.

Bölüm 2

1. Su, hidrojenleri ve oksijenleri birbirleriyle hidrojen bağı yapabilen (Yer yüzünün en yaygın sıcaklığında suyun sıvı olması için) polar bir moleküldür ve polar organik moleküller ile inorganik iyonlar için iyi bir çözücüdür. Su aynı zamanda, polar olmayan molekülleri veya molekül kısımlarını iterek, onları, hücre ve organel zarları gibi önemli yapılar oluşturmak üzere, bir araya gelmeye zorlar.

3. Glikojen, esas olarak $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlarıyla bir araya gelmiş glukoz polimeridir, dallanmaları oluşturan az sayıdaki $\alpha(1\rightarrow6)$ bağları da bulunur. Sellüloz, glukoz birimleri arasında $\beta(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla oluşan, düz, dallanmamış bir polimerdir.

5. Yağlar, hücrelerde yağ damlaları şeklinde birikir (özellikle adipoz hücrelerinde) ve etkin bir enerji depo formudur. Fosfolipidler, hücre zarlarının ana bileşeni olarak işlev görürler.

7. Glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, prolin, sistein, metiyonin, fenilalanin ve triptofan. Su tarafından uzaklaştırılmaya eğilimli olduklarından, genellikle, suda-çözünen enzimlerin iç kısmında bulunurlar.

9. Verilen değerleri;

$$\Delta G = \Delta G + RT\ln\frac{[B][C]}{[A]}$$

denklemine yerleştirecek olursak, $\Delta G = -1.93$ kcal/mol sonucu elde edilir. Şu halde, hücre içerisinde A, B ve C ye dönüştürülmek üzere, reaksiyon soldan sağa doğru ilerleyecektir.

11. Taşıyıcı proteinler, taşınmış olan her çözünen moleküle özgül bir bölgeden bağlanmalı, konformasyon değiştirmeli, diğer tarafa geçince serbest bırakarak tekrar eski konformasyona geri dönmeli; bu süreç, bağlanmadan ve konformasyon değiştirmeden, bir kanal içerisinden geçişe kıyasla daha uzun zaman alır.

Bölüm 3

1. Translasyon, bir RNA kalıbı üzerinden proteinlerin sentezlenmesidir.

3. Bir *in vitro* translasyon deneyinde, mRNA yerine poli-U eklenerek poli- fenilalanin elde edildi.Var olan tek nükleotid urasil olduğu ve diğer kanıtlar da üçlü şifreyi desteklediği için, saptanan ilk şifre fenilalanin için UUU oldu.

5. Bir veya iki nükleotidin eklenmesi ya da çıkartılması, o noktadan başlayarak üçlü okuma çerçevesini değiştirecek ve tümüyle farklı bir amino asit dizisi ortaya çıkacaktır. Halbuki, üç nükleotidlik bir değişiklik tek bir amino asit ekleyecek ya da çıkaracaktır. Bu, genellikle normal işleve sahip bir proteinle sonlanır.

7. Bir DNA dizininin, eğer dizinin uçlarındaki kısa diziler biliniyorsa, milyonlarca kopya olacak şekilde çoğaltılmasını sağlar.

9. UGC de sisteini kodladığı için bu mutasyon enzim fonksiyonunu etkilemez. Ancak, UGA dur kodonudur ve bu mutasyon enzim aktivitesini durdurur.

11. Haploid sperm, tek bir DNA dizisi başlangıç kopyası içerir. Her PCR döngüsü, başlangıç materyalini iki katına çıkartır ve 10 döngü sonunda, 2^{10} ya da yaklaşık bin kopya elde edilir. Otuz döngülük amplifikasyon sonucunda, 2^{30} ya da bir milyardan fazla kopya elde edilir.

13. *in vitro* mutagenez yoluyla, ilgilenilen amino asitlerde mutasyon oluşturulabilir. Daha sonra, mutasyona uğratılmış olan proteinin bakteride veya ökaryot hücrelerde ekspresyonunu takiben, bu mutasyonların katalitik aktivite üzerindeki etkileri belirlenebilir.

Bölüm 4

1. Komplekslik düzeyinden daha büyük genoma sahip organizmaların, protein kodlayan genlerinin veya eksonlarının arasında, daha büyük miktarda kodlamayan DNA bulunuyor olması gerekir.

3. Alternatif splicing, tek bir genin farklı proteinleri kodlamasını sağlar. Bu, gen sayısını artırmadan, bir organizmanın üretebildiği farklı proteinlerin sayısını artırır.

5. Sentromer, ökaryotik kromozomun, kardeş kromatidlerin birleştikleri ve mitoz sırasında iğ ipliklerinin tutunduğu bölgesidir.

   Kinetokor, mitoz sırasında sentromer üzerinde oluşan, iğ mikrotübüllerinin tutunduğu yapıdır.

7. a) Kromozomların uçlarının yıkılmasını veya birbiriyle birleşmesini engellemek için

   b) Kromozom uçlarının tamamen replike olmasını sağlamak için

9. Açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF), herhangi bir dur kodonu (UAA,UAG,UGA) içermeyen, uzun nükleik asit dizinidir.

   Açık okuma çerçevelerinin önemi, genellikle fonksiyonel genler olmalarıdır.

11. DNA'nın yeniden birleşmesi iki molekülü ilgilendiren bir olay olduğu için, reaksiyon hızı, DNA konsantrasyonunun karesi ile orantılıdır. Bu nedenle, genomda 1000 kez tekrarlanan bir dizi, tek kopya DNA'ya kıyasla 10^6- kat daha büyük bir hızla birleşir.

Bölüm 5

1. Polimeraz I ve II DNA hasarının onarımıyla ilgilidir. Polimeraz III DNA replikasyonunda görevli asıl enzimdir, polimeraz I, aksak iplikte primerleri uzaklaştırarak Okazaki fragmanları arasındaki boşluğu doldurur.

3. Topoizomeraz I, DNA çift sarmalında tek ipliği keser ve kıvrılma gerilimini azaltmak için, kesilen ipliğin diğer fosfodiester bağı etrafında dönmesini sağlar. Topoizomeraz II, DNA çift sarmalının iki ipliğini keser ve iç içe geçmiş molekülleri (örn., mitoz sırasında) çözmek için, diğer DNA molekülünü bu kesikten geçirir.

5. Memeli genomu bin kez daha büyüktür ve daha yavaş kopyalanır, bu nedenle, birkaç saat süren tipik DNA sentez evresinde replikasyonu tamamlamak için, daha fazla replikasyon orijinine gereksinimi vardır.

7. Telomeraz, telomer DNA'nın 3' ucuna kısa bir komplementer DNA eklemek için, kendi yapısındaki RNA dizinini kullanan bir revers transkriptazdır.

9. Çift iplik kırıkları rekombinasyonel onarım ile onarılır. Kardeş kromatid gibi homolog bir kromozomla rekombinasyon, kayıp kromozom parçasının, homolog kromozomun tek ipliğinden kopyalanmasına olanak sağlar.

11. Yüksek deri kanser sıklığı, Güneşten gelen UV ışınlarının uyardığı, nükleotid- çıkararak onarma sistemiyle onarılabilen DNA hasarının bir sonucudur. Diğer kanserlerin sıklığında artış olmaması, iç organlarda benzer tipte hasarın sık olmadığını ve bu organlardaki kanserlerin diğer mutasyon türlerinden kaynaklanmış olduğunu gösterebilir (örn., DNA replikasyonu sırasında yanlış baz katılması).

13. Bu ilaçlardan etkilenebilecek revers transkriptazlar, telomeraz ve LİNE dizilerinden kodlanan revers transkriptazdır. LİNE revers transkriptazlarının inhibisyonu hücreye zarar vermeyecektir, ancak, telomeraz inhibisyonu kromozom uçlarının replikasyonunu engelleyebilir.

Bölüm 6

1. Laktoz, *i* geninden sentezlenen bir repressöre bağlanarak, repressörün, *lac* operonunun operatör bölgesine bağlanmasını engeller. Bu, RNA polimerazın, operatörü geçip protein kodlayan bölgeleri uzun bir polisistronik mesaj olarak okumasına olanak verir.

3. Yabanıl-tip gen normal şekilde düzenlenecek, sıcaklığa-duyarlı gen ise konstitutif olarak eksprese edilecektir. Böylece, β-Galaktozidaz, permisif sıcaklıkta üretilirken, non-permisif sıcaklıkta üretilmez.

5. Sigma faktörleri, başlama noktasından 35 ve 10 baz çifti yukarıda,promotör bölge içerisindeki dizilere bağlanır ve RNA polimerazı, promotöre bağlanarak başlama noktasından transkripsiyonu başlatması için yönlendirir. Yaklaşık 10 nükleotid eklenmesinden sonra σ ayrılır.

7. RNA polimeraz I sadece, büyük 45S pre-rRNA'yı transkribe eder.

   RNA polimeraz II tüm mRNA ları ve bazı küçük nükleer RNA ları transkribe eder.

   RNA polimeraz III tRNA ları, 5S rRNA yı ve diğer bazı hüçük RNA ları transkribe eder.

9. Promotörlerin kodlayan dizilere yakın olmasına karşın, güçlendiriciler (enhancers) kodlayan diziden uzakta da etkili olabilirler.

11. Dokuya özgül alternatif splicing ile, faktörün aktivasyon bölgesine iki farklı DNA-bağlanma bölgesi yerleştirilebilir.

13. İki X kromozomundan biri, dişi (veya XXY erkek) gelişiminin erken döneminde inaktifleşir. *Xist* adı verilen ve iki kromozomdan birindeki *Xist* geni tarafından üretilen bir RNA, bu kromozom üzerindeki genlerin çoğuna bağlanır. *Xist* RNA'sı, olasılıkla histonları metilleyerek heterokromatin oluşturan proteinlerin çalışmasını sağlar.

Bölüm 7

1. Bir çok tRNA birden fazla kodonla hidrojen bağı yapabilir, çünkü, antikodonun üçüncü bazı, olağan komplementer eş dışında diğer nükleotidlerle de, standart-dışı eşleşebilir veya kararsız bir yakınlaşma (wobble) oluşturabilir.

3. Bir Shine-Delgarno dizisi gerekir.

5. Poliadenilasyon, gelişimin erken döneminde önemli, translasyon düzenleyici bir mekanizmadır. İnhibisyonu, döllenme sonrasında bir çok oosit mRNA sının translasyonunu bloke eder.

7. Yüksek sıcaklık proteinlerin doğasını bozabilir (denatüre edebilir). Isı-şok proteinleri, denatüre olmuş proteinlerin, tekrar doğal şekillerini oluşturmak üzere katlanmalarına yardım eden ve böylece kaybolan protein işlevinin geri kazanılmasını sağlayan, şaperonlardır.

9. Fosfolipaz işlemi plazma zarından, bir transmembran proteinini ayıramaz, ancak GPI-ile bağlı proteini serbestleştirir.

Bölüm 8

1. Ökaryotik transkriptler splicing ile işlenir ve nükleusdan çıkışları denetlenebilir. Ayrıca, transkripsiyon faktörlerinin denetledikleri genlere ulaşması, genellikle, nükleer porlardan taşınma yetileri değiştirilerek denetlenebilir.

3. Evet, 100kDa değil fakat 15kDa protein girebilir. 20kDa ya da daha küçük proteinler nükleus içerisine, açık sulu kanallardan serbestçe girebilirler.

5. Bunun bir örneği, B lenfositlerin kappa hafif zincir immün globulin geninin bir düzenleyicisi olan NF-κB dir. Uyarılmamış hücrelerde IκB, NF-κB'ye bağlanır ve kompleks nükleusa alınamaz. Uyarımdan sonra, IκB fosfatlanır ve ubikutin-aracılıklı proteoliz ile yıkılır. NF-κB üzerindeki nükleus yereltme sinyali meydana çıkar, nükleusa geçiş sağlanır ve hedef genlerden transkripsiyon başlar.

7. Nükleer dışarı gönderme sinyalinin inaktivasyonu, proteinin çekirdek içerisinde kalmasıyla sonuçlanır.

9. Nükleusa yerleşme sinyallerinin, nükleer proteinlerin üzerinde kaldığı görülmektedir, böylece, mitozun telofaz evresinde çekirdek zarfı yeniden oluştuktan sonra, bunlar tekrar içeriye alınabilirler. Mitoz sisteminin bir parçası olmayan nükleer proteinler, nükleus zarfının yıkılması sonrasında oluşan sitoplazma, nükleoplazma karışımına eklenirler.

Bölüm 9

1. Palade ve arkadaşları, pankreas asinar hücrelerini çok kısa süre için radyoaktif amino asitlerle muamele ettiler ve proteinlerin yapısına katılmalarını sağladılar. Otoradyografi, işaretli proteinlerin ilk önce granüllü ER'de ortaya çıktıklarını gösterdi. Radyoaktif olmayan amino asitlerin kısa bir süre izlenmesini takiben, işaretli proteinler Golgi aygıtına hareket ettiler ve daha uzun bir süre sonra, işaretli proteinler önce salgı keseciklerinde ve daha sonra hücrelerin dışında bulundu. Bu çalışma, salgı yolağının, granüllü ER→Golgi aygıtı→salgı kesecikleri→salgılanan protein şeklinde olduğunu gösterdi.

3. Translasyonla eş zamanlı translokasyon, sinyal tanıyan partiküllere bağlanıp, ribozomlar üzerindeki protein sentezinin itici gücüyle, bir translokon aracılığıyla translokasyonu kapsar. Translasyon sonrası translokasyon, bir polipeptidi, sentez tamamlandıktan sonra ER'a hedefler ve bunun için SRP gerekmez. Bir Sec 62/63 kompleksi, içeri alınacak polipeptidi tanır ve onu bir translokonun içerisine sokar. Polipeptid, ER lümenindeki, "BiP" adı verilen bir şaperon tarafından içeri çekilir.

5. Karbohidrat grupları, topolojik olarak hücre dışına eşdeğer olan ER lümeninde ve Golgi aygıtında eklenir.

7. Başlangıçta, bir sinyal dizisi, yeni sentezlenmiş lizozomal polipeptidi ya da pre-lizozomal proteini RER'e hedefler ve RER'e giren proteine N-bağlı oligosakkarid eklenir. Golgi'ye geldiğinde, normalde uzaklaştırılan üç mannoz uzaklaştırılmak yerine, iki aşamalı bir işlemle mannoz-6-fosfata dönüştürülür (bu olay *cis* Golgi'de olur). Bu mannoz-6-fosfatlar, bu proteinlerin lizozomlara aktarımını sağlayacak olan *trans* Golgi'deki bir reseptör tarafından tanınır ve bağlanır.

9. Golgi aygıtında mannoz-6-fosfat oluşumu gerçekleşmezse, normal koşulda, lizozomal proteinler salgılanacaktır.

11. Rothman ve arkadaşları tarafından, proteinlerin, Golgi aygıtlarının sisternaları arasında vesiküllerle taşınımını göstermek için, hücresiz transport sistemi kullanıldı. Glikoproteinlere N-asetil glukozamin bağlayan enzimi içermeyen, virusla enfekte, mutant hücre hattından Golgi aygıtlarını izole ettiler ve bunları, virusla enfekte olmamış, normal hücrelerden alınmış bol miktarda Golgi ile karıştırdılar. Virus glikoproteininin bu Golgi karışımında N-asetilglukozamin eklenerek değiştirildiğini göstererek, proteinlerin bir Golgi kümesinden diğerine vesiküllerle taşındığını kanıtladılar.

Bölüm 10

1. Mitokondri iç zarının yüzey alanı, krista oluşumları nedeniyle yüksektir. Aynı zamanda, zarın protein içeriği de genellikle yüksektir (>%70), bir çok enzimi ve elektron taşıyıcıları kapsar.

3. Bu koşullarda, ΔG yaklaşık olarak – 1.4 kcal/mol dür.

5. İlk olarak, pozitif-yüklü içeri alma sinyali, mitokondri matriksine girişi sağlar ve burada bu öncül dizi çıkarılır, ikinci olarak, hidrofobik dizi polipeptidi, iç zardaki bir translokaz olan ve sitokrom b_2'yi zarlar arası alana geçirecek olan, Oxa1'e taşır.

7. F_0 mitokondrilerin iç zarını ve kloroplastların tilakoid zarını kat eder. F_1, F_0'dan, mitokondrilerin matrisine ve kloroplastların stromasına uzanan sap ve yumrudur. F_0 kompleksi, protonların matrikse ya da stromaya geri akışını sağlayan bir kanal oluşturur. Sapın mekanik desteği F_1 içerisinde bir dönme sağlar ve bu da ATP senteziyle sonuçlanır.

9. Her H_2O molekülünün ayrışması için iki yüksek-enerjili elektron gerekir, yani, her bir glukoz molekülünün sentezlenmesi için 24 yüksek-enerjili elektron gerekmektedir. Bu elektronların iki fotosistemden geçişi, sitokrom *bf* kompleksinin proton pompalama kapasitesine bağlı olarak, 12 NADPH molekülü ve 12 ila 18 kadar ATP molekülü üretir. Calvin döngüsü 18 ATP gerektirdiğinden, glukoz sentezi için, döngüsel elektron akışından da ayrıca ATP gerekebilir.

11. Peroksizom proteinleri sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenir ve ya karboksil ucundaki Ser-Lys-Leu sinyal dizisiyle ya da amino ucundaki dokuz amino asit dizisiyle, peroksizoma hedeflenir.

Bölüm 11

1. Aktin filamanı oluşurken, tüm asimetrik G aktin alt birimleri benzer yönelimle eklendikleri için filamanın iki ucu farklıdır.

3. Sitokalasinler, aktin filamanlarının artı ucuna bağlanarak uzamalarını durdururlar. Böylece 'treadmilling' mikrofilamanlar depolimerize olur. Falloidinler aktin filamanlarına bağlanarak yıkılmalarını önlerler. Filamanlar yürümeyi (treadmilling) durdurur fakat durumlarını korur ve uzayabilirler.

5. En olası tanı Duchenne kas distrofisidir. Bu hastalığın nedeni, aktin filamanlarını, kas hücrelerini hücre dışı matrise bağlayan plazma zarı glikoproteinine tutturan distrofin proteininin genindeki mutasyondur.

7. Aktin filamanlarının polaritesi miyozin hareketinin yönünü belirler. Aktin filamanları polar olmasaydı, aktin ve miyozin filamanlarının kaymasını sağlayan tek yönlü miyozin hareketi gerçekleşemezdi.

9. Hayır. Keratin sadece epitel hücrelerinde eksprese olur.

11. Neksin, kirpik (silia) mikrotübül çiftlerini birbirine bağlayarak, bireysel mikrotübüllerin kaymasını, kirpik ritmini sağlayan eğilme hareketine dönüştürür. Ortadan kaldırılmaları halinde, mikrotübüller sadece birbiri üzerinde kayar.

Bölüm 12

1. Yüksek sıcaklıklarda, kolesterolün halka yapısı çift tabakadaki fosfolipidlerin hareketlerini engeller ve böylece, zarın akışkanlığı azalır, dayanıklılığı artar. Düşük sıcaklıklarda, kolesterolün yapısı yağ asidi zincirlerinin etkileşimini engelleyerek, zar akışkanlığını korur.

3. Plazma zarında porinlerin bulunması, sitozol ile hücre dışı matris arasında iyonların ve küçük moleküllerin serbestçe dolaşımına neden olacaktır ve bu hücre için bir felakettir.
5. İlk olarak, glikokaliks hücre yüzeyini korur (örn., barsak sistemindeki proteazlardan). İkinci olarak, glikokaliks hücre-hücre etkileşmesiyle ilişkilidir (örn., selektinlere bağlanarak).
7. Bitki hücre duvarı hücrenin şişmesini önler ve turgor basıncı gelişimine olanak verir.
9. Gram-pozitif bakteriler, tek bir zara, kalın peptidoglikan hücre duvarıyla çevrili plazma zarına sahiptir. Gram-negatif bakteriler, bir plazma zarı, bir dış zar ve ikisinin arasında ince bir peptidoglikan hücre duvarı içerirler.
11. Aktif taşıma ve kolaylaştırılmış difüzyonu sağlayan taşıyıcıların doğru yerleşimi, epitel hücrelerinin, glukozu barsak lümeninden kan dolaşımına aktarmasını sağlayan, polarize fonksiyonu için gereklidir. Sıkı bağlantılar, bu taşıyıcıların, plazma zarının farklı bölümleri arasında difüzyonunu engelledikleri gibi, epiteldeki hücrelerin arasında kalan alanları da kapatırlar.

Bölüm 13

1. Endokrin sinyal iletimi endokrin bezlerinden hormonların salgılanması iken, parakrin sinyal iletimi, bir veya birkaç hücreden salınan moleküllerin sadece yakındaki hücreleri etkileme durumudur. Hormonlar, o hormon için bir reseptöre sahip olan tüm hedef hücreleri etkilemek üzere, tüm vücuda taşınır.
3. Hidrofobik sinyal molekülleri plazma zarından difüzyonla geçerek, sitozoldeki ya da nükleusdaki reseptörlere bağlanırlar. Protein hormonlar gibi hidrofilik sinyal molekülleri, plazma zarından difüzyonla geçemezler, hücre–yüzey reseptörlerine bağlanırlar.
5. cAMP fosfodiesteraz'ın baskılanması, cAMP düzeyinde artışa ve dolayısıyla, hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olacaktır.
7. PDGF monomerleri reseptör dimerizasyonunu indüklemez. Bu, reseptör protein-tirozin kinazlardan sinyal iletiminin ilk, önemli aşaması olduğu için, PDGF reseptörlerini uyaramayacaklardır.
9. cAMP, protein kinaz A'nın düzenleyici alt birimine bağlanarak, protein kinaz A'nın iki küçük katalitik alt birimini serbestleştirir ve bunlar da, nükleer porlardan geçerek nükleusa girerler. Nükleusda, PKA CREB'i fosfatlar, o da CRE lere bağlanarak, cAMP tarafından uyarılabilen genleri aktive eder.
11. Hücreler akut yaralanma ya da nekroz nedeniyle öldüklerinde, parçalanarak içeriklerini hücre dışı ortama verirler ve bu, yangıya neden olur (ve otoimmün yanıtları uyarabilir). Hücreler apopitozla öldüklerinde, hücre proteinlerini ve DNA'sını yıkan bir dizi programlı değişikliğe uğrarlar. Nihayet, hücre bir dizi küçük, zarla çevrili parçaya ayrılır, bunlar da, makrofajlar ve diğer fagositoz yapan hücreler tarafından etkin bir şekilde uzaklaştırılır.

Bölüm 14

1. G_0 ve G_1 hücrelerin her ikisi de aynı miktarda DNA içerir (insan hücrelerinin çoğunda diploid) ve her ikisi de metabolik olarak aktiftir. G_0 hücreleri, hücre döngüsüne yeniden katılmaları için uyarılmadıkları (örn., yüksek düzeyde, özgül büyüme faktörleri ile) sürece çoğalmayışları ile G_1 hücrelerden farklıdırlar.
3. G_1 ve S evresi kontrol noktalarında engelleme, hatanın artmasına neden olabilecek olan, hasarlı DNA'nın onarılmadan kopyalanma olasılığını azaltır. G_2 kontrol noktasında engellenme, hasarlı DNA'nın yavru hücrelere aktarılmasını önlemek üzere, mitozdan önce DNA daki kırıkların ya da diğer hasarın onarılması için zaman kazandırır.
5. Normal bir hücrede aşırı p16 üretimi, G_1 deki engelleme noktasında hücre döngüsü ilerlemesini durdurur. Rb, Cdk 4, 6/siklin D kompleksinin başlıca hedefi olduğu için, işlevsel bir Rb'ye sahip olmayan tümör hücresi, aşırı p16 üretiminden etkilenmeyecektir.
7. MPF, özelliklerini değiştirmek ve mitozu başlatmak için, birkaç yapısal proteini direkt olarak fosfatlar. Bunların arasında; kondensinler (kromozom yoğunlaşmasından sorumlu), histon H1, nükleer laminler, Golgi matris proteini GM130 ve mikrotübül-ilişkili proteinler bulunur. MPF aynı zamanda, M'de ilerlenmesini sağlayacak bir protein kinazlar yolağı başlatır.
9. Bu farenin oositleri metafaz II'de durmaz.
11. Bir kök hücresi, farklılaşabilen ya da kök hücresi olarak kalan yavru hücreler oluşturmak üzere bölünen hücredir.

Bölüm 15

1. Kanser, bir malin tümördür. Malin tümörler, kontrolsüz şekilde büyür ve bölünürler ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilir ya da yayılabilirler. İyi huylu tümörler, anormal büyüme gösterirler ancak, bulundukları yerde sınırlı kalırlar.

3. Östrojenler, meme ve endometrium hücreleri gibi, östrojene yanıt veren hücrelerin çoğalmasını hızlandırarak, tümör kamçılayıcı rolü oynarlar.

5. Bu virusların her üçü de, Rb ve p53 tümör baskılayıcı proteinlerinin aktivitelerini engelleyerek hücreleri transforme ederler.

7. *gsp* geni, adenilil siklaz'ı uyaran G_s'nin α alt birimini kodlar. Bu nedenle, üremesi cAMP tarafından engellenen hücrelerde onkogen olarak davranmaz.

9. INK4, Cdk4, 6/siklin D komplekslerini inhibe eden Cdk inhibitörü p16'yı kodlar. Rb fosforilasyonu Cdk4, 6/siklin D'nin önemli bir hedefi olduğundan, Rb'nin inaktive edilmiş olduğu hücreler üzerinde p16'nın hiçbir etkisi olmaz.

11. Yatkınlık dominant olsa da, heterozigotlar, tümör büyümesini baskılamaya yetecek kadar Rb proteinini üreten normal Rb genine sahiptirler. Ancak bu normal Rb geninin mutasyona uğraması halinde (gelişim sürecinde üretilen retina hücrelerinin sayısı göz önüne alındığında gayet olası), tümör gelişecektir.

Sözlük

α sarmal Bir polipeptid zincirinin amino asitleri arasında, dört amino asitte bir kurulan hidrojen bağlarının oluşturduğu kıvrımlı sekonder yapı.

α-aktinin Aktine bağlanan ve aktin filamanlarını birbirine bağlayıp, kasılan demetler oluşumunu sağlayan bir protein.

ABC taşıyıcılar Yüksek oranda korunmuş ATP bağlama bölgesi ile tanımlanan, geniş bir, zar taşınımı protein ailesi.

abl Bir protein-tirozin kinaz kodlayan ve kronik miyeloid lösemide kromozom translokasyonu ile aktive olan bir proto-onkogen.

absisik asit Bir bitki hormonu.

acil-erken genler Büyüme faktörü uyarısına yanıt olarak transkripsiyonu hızla indüklenen genler ailesi.

açık-okuma çerçevesi Dur kodonları içermeyen ve bir polipeptidi kodlayabilen nükleotid dizisi.

adaptin Zardaki reseptörlere bağlanarak klatrin-kaplı veziküllerin oluşumunu sağlayan protein.

adenilil siklaz ATP'den, siklik AMP oluşumunu katalizleyen enzim.

adenin Timin ya da urasil ile eşleşen bir pürin.

adenom Bez epitelinden köken alan bir selim tümör.

adezyon kemeri Epitel hücrelerinin çevresinde, kasılan aktin filaman demetinin plazma zarına bağlandığı, kemer benzeri yapı.

ADF/kofilin Aktin filamanlarını ayrıştıran bir aktin-bağlayan protein ailesi.

akış sitometresi Hücrelerin tek, tek floresans yoğunluklarını saptayan alet.

akışkan mozaik model Proteinlerin, akışkan fosfolipid çift tabaka içerisine yerleştiği zar yapısı modeli.

aksak iplik Replikasyon çatalının hareket yönünün aksi yönüne doğru, Okazaki parçalarının birbirine bağlanması ile sentezlenen DNA ipliği.

aksiyon potansiyeli Aksonlar boyunca iletilen sinir impulsları.

aksonem Kirpik (silia) ve kamçının (flagella), ortada bir çift mikrotübül ve çevreleyen dokuz mikrotübül çiftinden oluşan, temel yapısı.

aksonemal dinein Kirpik (silia) ve kamçı (flagella) yapısında bulunan dinein tipi.

Akt PIP_3 tarafından aktive edilen ve hücrenin hayatta kalması sinyalinin iletiminde anahtar rol oynayan bir protein-serin / treonin kinaz.

aktif bölge Bir enzimin, sübstratları bağlayarak bir enzimatik tepkime katalizlediği bölgesi.

aktif taşıma Moleküllerin zardan, olumsuz yönde ve ATP hidrolizi veya diğer bir enerji kaynağının desteğiyle taşınması.

aktin ağı Gevşek, üç boyutlu ağ örgüsü şeklinde birbirine bağlanan aktin filamanları.

aktin demeti Sıkıca paketlenmiş düzende birbirine bağlanmış aktin filamanları.

aktin Bol miktarda bulunan ve hücre iskelet filamanları oluşturmak üzere polimerleşen, 43 kd bir protein.

aktin-bağlayan proteinler Aktine bağlanarak, aktin filamanlarının oluşumunu, yıkılımını ve organizasyonunu düzenleyen proteinler.

aktin-demetleyen proteinler Aktin filamanlarını, demet oluşturacak şekilde birbirine bağlayan proteinler.

aktivasyon enerjisi Bir molekülü, bir kimyasal tepkimeye girmek üzere, geçiş durumuna çıkarmak için gerekli enerji.

allel Genin tek kopyası.

allosterik düzenlenme Enzimlerin, aktif bölgesinden farklı bir bölgesine bağlanarak konformasyonunu ve katalitik aktivitesini değiştiren küçük moleküllerle regülasyonu.

alternatif kesip-ekleme (splicing) Pre-mRNA nın kesilip yeniden birleştirilme paternini değiştirerek farklı mRNA ların elde edilmesi.

amfipatik Hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgelere sahip molekül.

amiloplast Nişasta depolayan plastid.

amino asit Bir karboksil grubu, bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve bir ayırt edici yan zincirin bir karbon atomuna bağlanmasıyla oluşan, protein monomerleri.

aminoaçil tRNA sentetaz Özgül amino asidi, doğru antikodon dizisine sahip bir tRNA molekülüne bağlayan enzim.

anafaz A Mitoz sırasında, yavru kromozomların, iğin kutuplarına doğru hareketi.

anafaz B Mitoz sırasında, iğ kutuplarının birbirinden ayrılması.

anafaz Kardeş kromatidlerin ayrılıp, iğin zıt kutuplarına doğru hareket ettikleri mitoz evresi.

anafaza-ilerleten kompleks Siklin B ve kohesinlerin yıkımını uyararak, metafazdan anafaza geçişi tetikleyen bir ubikütin ligaz.

anahtar-kilit modeli Sübstratın enzim aktif merkezine tam olarak uyduğu enzim etki modeli.

anjiyogenez Yeni kan damarlarının oluşumu.

ankirin Spektrini bağlayarak, aktin hücre iskeletini plazma zarına bağlayan protein.

anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı Tam açık-okuma çerçevesi içermeyen mRNA'ların yıkımı.

antijen Ona karşı bir antikorun yöneltildiği molekül.

antikodon Mesajcı RNA'daki kodon dizisi ile tamamlayıcı baz eşleşmesi yapan, taşıyıcı RNA nükleotid dizisi.

antikor B lenfositler tarafından üretilen ve yabancı bir moleküle bağlanan protein.

antiport Zardan, iki molekülün aksi yönlere doğru taşınması.

antisens nükleik asitler İlgilenilen bir mRNA'ya komplementer olan ve gen ekspresyonunu durdurmak amacıyla kullanılan nükleik asitler (RNA veya DNA).

AP endonükleaz DNA'yı pürinsiz (apürinik) veya pirimidinsiz (apirimidinik) bölgenin yanından kesen DNA onarım enzimi.

apikal bölge Epiteldeki polarize bir hücresinin, görünen serbest yüzeyi.

apoptoz Kromozomal DNA'nın kesilmesi, kromatinin toplanması ve hem nükleusun hem hücrenin parçalanması ile nitelendirilen, aktif, programlı hücre ölüm süreci.

apoptozom Mitokondriden sitokrom c'nin serbestleşmesini takiben, apoptozu başlatmak üzere kaspaz-9'un, içerisinde aktifleştiği protein kompleks.

ara filaman Dokudaki hücrelere mekanik güç sağlayan, 10nm çapında hücre iskeleti filamanı.

Arabidopsis thaliana Bitki gelişim ve moleküler biyolojisi için bir model olarak kullanılan, küçük bir çiçekli bitki.

aracı Ökaryotik protein- kodlayan genlerin, gene-özgül düzenleme faktörlerine yanıt vermesine aracılık eden protein kompleksi.

aralayan (spacer) diziler Genler arasındaki DNA dizileri.

aralık bağlantı Bitişik hücreler arasında direkt sitoplazmik bağlantı sağlayan plazma zar kanalı.

arkebakteriler İki ana prokaryot grubundan biri; archeabakterilerin bir çok türü, ilkel yer kürede geçerli olanlara benzeyen, aşırı koşullarda yaşarlar.

ARF *Trans*-Golgi ağından vezikül tomurcuklanması için gerekli olan, GTP-bağlayan bir protein.

ARP 2/3 kompleksi Aktin filamanlarına bağlanarak dallanmayı başlatan bir protein kompleks.

aterens bağlantı Aktin hücre iskeletinin plazma zarına sıkıca bağlandığı, hücre-hücre adezyon bölgesi.

ATP (adenozin 5'-trifosfat) Hücrede serbest enerjinin depolanması için kullanılan, adenin-içeren bir nükleozid trifosfat.

ATP sentaz Zarı kat eden ve protonların zardan, enerjetik olarak yeğlenen yönde, geçişini ATP senteziyle eş zamanlayan, protein kompleks.

aydınlık-alan mikroskopisi Işığın doğrudan hücrenin içinden geçtiği, en basit ışık Mikroskopi tarzı.

azot fiksasyonu Atmosferik azotun (N_2) NH_3'e indirgenmesi.

β tabakası Bir polipeptid zincirinin, polipeptidin farklı bölgelerinde yerleşik amino asitler arasında hidrojen bağları ile oluşan, tabaka şeklindeki sekonder yapısı.

β-fıçısı β tabakalarının fıçıya benzer bir yapıda katlanmasıyla oluşan, bir transmembran domeyn.

bağlantı kompleksi Bir sıkı bağlantı, bir aterens bağlantı ve bir desmozom içeren, hücre-hücre temas bölgesi.

bakteri yapay kromozomu (BAC) Uzun DNA parçalarının bakterilerde klonlanması amacıyla kullanılan bir vektör tipi.

bakteriyofaj Bir bakteri virusu.

bakulovirus Ökaryot proteinlerinin böcek hücrelerinde üretimi için, bir ekspresyon vektörü olarak, sıklıkla kullanılan bir virus.

basit-dizi tekrarları Ardışık düzende binlerce kısa dizi tekrarlarından oluşan, bir tekrarlayan DNA dizisi grubu.

baskın Birden fazla allel bulunması durumunda, organizmanın fenotipini belirleyen allel.

baskın engelleyici mutant Genin normal allelinin fonksiyonunu engelleyen mutant.

bazal cisim Aksonemal mikrotübüllerin uzamasını başlatan ve kirpik ve kamçıları hücre yüzeyine sıkıca bağlayan, sentriole benzer bir yapı.

bazal lamina Kas hücrelerini, adipoz hücrelerini ve periferal sinirleri kuşatan ve epitel hücrelere destek olan, tabaka şeklindeki hücre dışı matris.

baz-çıkararak onarma DNA molekülünden, hasarlı tek bazların çıkartılması şeklindeki DNA onarım mekanizması.

bazolateral bölge Polarize epitel hücresinin,bitişik hücrelerle ya da hücre dışı matrisle temasta olan yüzey alanı.

Bcl-2 Programlanmış hücre ölümünü düzenleyen proteinler ailesinin bir üyesi.

birincil yapı Bir polipeptid zincirinde amino asitlerin dizilimi.

bitki hormonları Bitki dokularının çevresel sinyallere yanıtını ayarlayan bir grup küçük molekül.

biyoinformatik Genom dizini gibi, büyük miktardaki biyolojik veriyi analiz etmek için, bilgisayar yöntemlerinin kullanılması.

bölgeye-özgül rekombinasyon Özgül DNA dizilerini tanıyan proteinler aracılığıyla gerçekleşen rekombinasyon.

brasinosteroid Bitki steroid hormonu.

büyüme faktörleri Hayvan hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen polipeptidler.

***cis*-Golgi ağı** Golgi aygıtının, endoplazmik retikulumdan gelen proteinlerin giriş yaptığı bölgesi.

c-myc Bir transkripsiyon faktörü kodlayan ve insan tümörlerinde, kromozom translokasyonu ya da gen amplifikasyonu ile, sıklıkla aktive olan bir proto-onkogen.

COP-kaplı vezikül Klatrin dışında, diğer proteinlerle kaplanmış taşıma vezikülü (COP kılıf proteinini simgeler).

CREB Siklik AMP yanıtlı eleman-bağlayan protein. Siklik AMP-bağımlı protein kinaz tarafından aktiflenen bir transkripsiyon faktörü.

çekinik Baskın allel tarafından maskelenen allel.

çekirdek zarları Çekirdek zarfını oluşturan zarlar; dış çekirdek zarı endoplazmik retikulum ile devam eder, iç zar ise nükleer laminaya bitişiktir.

çekirdek zarfı Bir iç ve dış zardan, nükleer laminadan ve nükleer por komplekslerinden oluşan, nükleusu sitoplazmadan ayıran engel.

çinko parmak bölgesi Çinko iyonlarını bağlayan sistein ve histidin amino asitlerine sahip halkalardan oluşan, DNA'ya bağlanan bir domeyn tipi.

Caenorhabditis elegans Gelişmenin, basit çok hücreli modeli olarak kullanılan bir nematod (yer solucanı).

Calvin döngüsü Altı CO_2 molekülünün glukoza çevrildiği bir reaksiyonlar dizisi.

CaM kinaz Ca^{2+}/ kalmodulin bağlanmasıyla aktive olan protein kinazlar ailesinin bir üyesi.

cAMP fosfodiesteraz Siklik AMP'yi yıkan enzim.

cAMP-bağımlı protein kinaz bkz. Protein kinaz A

cAMP-yanıt elemanı (CRE) Hedef genlerin, cAMP'ye transkripsiyonel yanıtını sağlayan bir regülatör dizi.

Cdc2 Ökaryot hücrelerde mitozun ana regülatörü olan bir protein serin / treonin kinaz.

Cdc42 Küçük, GTP-bağlayan proteinlerin Rho alt ailesinin bir üyesi.

Cdk inhibitörü (CKI) Cdk lara bağlanarak aktivitelerini baskılayan bir protein ailesi.

Cdk lar Ökaryotlarda hücre döngüsünü denetleyen, sikline bağımlı protein kinazlar. bkz. Cdc2.

cDNA kütüphanesi Rekombinant cDNA klonlarının koleksiyonu.

cGMP fosfodiesteraz cGMP'yi yıkan enzim.

***cis*-etkili kontrol elemanı** Protein bağlanma bölgesi oluşturarak, bitişik genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir düzenleyici DNA dizini.

denge santirfügasyonu Yoğun bir madde gradientinde dengeye ulaşana kadar santirfüjlenerek, partikülleri, yoğunluklarına göre ayrılması.

deoksiribonükleik asit (DNA) Hücrenin kalıtım maddesi.

2'-deoksiriboz DNA'da bulunan, bir beş karbonlu şeker.

desmin Kas hücrelerinde üretilen bir ara filaman proteini.

desmozom Epitel hücreleri arasında, keratin filamanlarının plazma zarına kenetlendiği bir temas bölgesi. bkz. hemidesmozom.

diaçilgliserol PIP2 hidrolizi ile oluşan ve protein kinaz C'yi aktifleyen, bir ikincil mesajcı.

Dictyostelium discoideum Hücre hareketi ile hücre-hücre haberleşmesi çalışmalarında kullanılan, bir tek hücreli ökaryot.

dideoksinükleotidler Normal deoksiribozda bulunan 3' hidroksil grubunu içermeyen ve DNA dizinlenmesinde zincir uzamasını durdurma amacıyla kullanılan nükleotidler.

diferansiyel interferens-kontrast mikroskopi Hücrelerin farklı bölümlerinin yoğunluk ve kalınlık değişikliklerini, son görüntüde kontrast farklılığı olarak yansıtan mikroskopi tipi.

diferansiyel santrifügasyon Hücre bileşenlerini, büyüklük ve yoğunluklarına göre ayırmak için kullanılan bir yöntem.

dinamik kararsızlık Mikrotübüllerin uzama ve kısalma döngüleri arasında değişimi.

dinein Mikrotübüller üzerinde eksi uca doğru hareket eden motor protein.

diploid Her kromozomdan iki kopya taşıyan hücre ya da canlı.

diploten Mayoz I'de eş kromozomların, birbirlerinden uzunlamasına ayrıldıkları ancak kiyazmalarla bağlı kaldıkları aşama.

distrofin Kas hücrelerinin hücre iskelet proteini.

diyakinez Mayoz I profazının, kromozomların tamamen yoğunlaştığı ve hücrenin metafaza doğru ilerlediği son aşaması.

DNA glikozilaz Bir pürin ya da pirimidini, DNA omurgasını oluşturan deoksiriboza bağlayan bağı kesen bir DNA onarım enzimi.

DNA ligaz DNA ipliğindeki kırıkları yapıştıran bir enzim.

DNA mikrodizin Üzerine oligonükleotidler ya da cDNA fragmanları yoğun şekilde tutturulmuş olan ve floresan probların hibridizasyonu yoluyla, aynı anda binlerce genin analizini sağlayan, bir lam ya da zar filtre.

DNA polimeraz DNA sentezini katalizleyen enzim.

DNA transpozonlar DNA aracılar yoluyla hareket ederek yer değiştirebilen öğeler.

DNA-afinite kromatografisi DNA'ya bağlanan proteinleri, özgül DNA dizinlerine bağlanma özelliklerine dayanarak izole etmek için kullanılan bir yöntem.

dolikol fosfat Endoplazmik retikulumda bulunan ve proteinlerin glikozillenmesi için, oligosakkaridlerin üzerinde toplandıkları, bir lipid molekülü.

domeynler Proteinlerde, üçüncül yapının temel birimi olan, yoğun küresel bölgeler.

dondurup-çatlatma Örneklerin sıvı nitrojende dondurulduktan sonra, hücre zarının ara yüzeyini ortaya çıkaracak şekilde lipid çift tabakanın ayrılması için çatlatılması esasına dayalı bir elektron mikroskopi yöntemi.

döngüsel elektron akımı Fotosistem I'de NADPH sentezlemeden sadece ATP üreten bir elektron taşınım yolağı.

Drosophila melanogaster Hayvan genetiği ve gelişimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir meyve sineği türü.

dördüncül yapı Birden fazla polipeptidden oluşan proteinlerde, polipeptid zincirleri arasındaki etkileşim.

düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL) Kolestrolün kanda dolaşımını sağlayan lipoprotein taneciği.

düz endoplazmik retikulum Ökaryot hücrelerde majör lipid sentez bölgesi.

E2F Hücre döngüsü ilerlemesi ile DNA replikasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesi.

ekdizon Böceklerde metamorfozu tetikleyen bir steroid hormon.

eksinükleaz Bakterilerde nükleotid kesip-çıkarma onarımı (eksizyon onarımı) sırasında hasarlı DNA yı kesip çıkaran enzim kompleksi.

ekson Bir genin kodlayan diziler içeren parçası.

eksonükleaz DNA moleküllerini 5' den 3' veya 3' den 5' yönlerinde hidrolize eden enzim.

eksportin Çekirdekten dışarı gönderme (eksport) sinyallerini algılayarak, nükleusdan sitoplazmaya aktarımı yönlendiren karyoferin.

ekspresyon vektörü Klonlanmış bir DNA'nın konakçı hücre içerisinde ekspresyonunu yönlendiren vektör.

ektoderm Deri ve sinir sistemini de kapsayan dokuların geliştiği, dış germ tabakası.

elastik lifler Organlarda, bağ dokusunun hücre dışı matrisinde bulunan ve gerilip tekrar eski şeklini alabilen ipliksi proteinler.

elastin Elastik liflerin esas bileşeni.

elayoplastlar Lipid depolayan plastidler.

elektroforetik devingenlik değişim analizi Bir proteinin özgül bir DNA dizinine bağlanmasını incelemeye yarayan bir test.

elektrokimyasal gradient Bir zarın iki yanında kimyasal konsantrasyon ve elektrik potansiyel farklılığı.

elektron mikroskopi Görüntü oluşturmak için elektron demeti kullanan bir mikroskopi türü. Transmisyon elektron mikroskopisinde, elektron demeti, ağır metallerle boyanmış bir örnek içerisinden geçer. Tarama elektron mikroskopisinde, üç boyutlu görüntü oluşturmak üzere, örnek yüzeyinden yansıyan elektronlar analiz edilir.

elektron taşıma zinciri Elektronların yüksek enerji düzeyinden, daha düşük enerji düzeyine içerisinden geçerek taşındığı bir dizi taşıyıcı.

elektroporasyon DNA'nın hücrelerin içine, kısa elektrik akımı uygulanarak sokulması.

Elk-1 ERK fosforilasyonu ile aktiflenen ve acil-erken genlerin ekspresyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörü.

embriyonik kök (ES) hücreler Erken embriyodan kültürlenen kök hücreler.

endoderm İç organların geliştiği, içteki germ tabakası.

endokrin sinyal iletimi Endokrin hücrelerden salgılanan hormonların, dolaşımla, uzaktaki hedef hücrelere taşındığı hücre-hücre etkileşim şekli.

endoplazmik retikulum (ER) Protein işlenmesi ve dağıtımı ile lipid sentezinde görevli, zarla çevrili tüp ve keselerden oluşan geniş bir ağ.

endorfin Doğal analjezik etkili bir nöropeptid.

endosimbiyoz Bir hücrenin daha büyük bir hücre içerisinde yerleştiği simbiyotik ilişki biçimi.

endositoz Hücre dışı materyalin, plazma zarından oluşmuş kesecikler (vezikül) içerisinde alınması.

endozom Endositozla alınan materyalin sınıflanması ve lizozoma aktarılması ile görevli kese şeklindeki bölme.

enkefalin Doğal analjezik etkili bir nöropeptid.

entaktin Bazal laminada tip IV kollajen ve lamininle bağlanan bir hücre dışı matris proteini.

enzim Biyolojik tepkimeleri katalizleyen proteinler ya da RNA lar.

epidermal büyüme faktörü (EGF) Hücre çoğalmasını uyaran bir büyüme faktörü.

epidermal hücreler Bitki ve hayvanların yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturan hücreler.

epitel hücreler Vücudun yüzeyini kaplayan ve iç organları saran tabakaları (epitel doku) oluşturan hücreler.

Epstein-Barr virusu B-hücre lenfomalarına neden olan bir insan herpesvirusu.

ErbA Tiroid hormon reseptörü kodlayan bir proto-onkogen.

***erb*B-2** Meme ve over kanserlerinde genellikle amplifiye olan ve bir reseptör protein kinaz kodlayan proto-onkogen.

eritrosit Kırmızı kan hücreleri.

ERK Büyüme faktörüyle uyarılan hücre çoğalmasında temel rol oynayan bir MAP kinaz ailesi üyesi.

ERM proteinleri Bir çok hücre tipinde aktinleri plazma zarına bağlayan bir protein ailesi.

***Escherichia coli* (*E.coli*)** Moleküler biyoloji alanında model sistem olarak geniş ölçüde kullanılan bir bakteri türü.

etilen Meyve olgunlaşmasını sağlayan bir bitki hormonu.

etyoplast Kloroplast gelişiminde klorofil sentezinin yapılmadığı bir ara dönem.

fagolizozomlar Bir fagozom ya da otofagozom ile birleşen lizozom.

fagositoz Bakteriler gibi büyük partiküllerin hücreler tarafından alınması.

fagozom Fagositozla alınan partikülü içeren vakuol.

FAK (fokal adezyon kinaz) İntegrin sinyal iletiminde önemli rol oynayan bir non-reseptör protein-tirozin kinaz.

falloidin Aktin filamanlarına bağlanarak dağılmalarını engelleyen bir ilaç.

faz-kontrast mikroskopisi Hücre bölümleri arasındaki yoğunluk ve kalınlık farklılıklarını, son görüntüye kontrast farklılığı olarak aktaran bir mikroskopi tipi.

fenotip Bir organizmanın fizik görünümü.

fırça kenar Bir mikrovili tabakasına sahip hücre yüzeyi (örn., barsak epitel hücresi).

fibroblast Bağ dokusunda bulunan bir hücre tipi.

fibronektin Hücre dışı matrisin başlıca adezyon proteini.

filamanı [F] aktin Filamanlar şeklinde polimerize olan aktin monomerleri.

filamin Aktin filamanlarını ağ oluşturmak üzere çapraz bağlayan bir aktin-bağlayan protein.

filopodyum Plazma zarının aktin demetleri tarafından desteklenen, ince uzantısı.

flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$) Oksitlenme (yükseltgenme) ve redüklenme (indirgenme) reaksiyonlarında elektron taşıyıcı görevi üstlenen bir koenzim.

floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) Floresan problar kullanılarak, kromozomlar üzerinde genlerin ya da hücre içerisinde RNA'ların yerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem.

floresans mikroskopisi Moleküllerin, floresan ışık yayılımı yoluyla belirlenmesine olanak veren bir mikroskopi türü.

floresans uyarımlı hücre-ayırıcı Hücreleri floresans yoğunluklarına göre ayıran alet.

fodrin Eritrosit harici spektrin.

fokal adezyon Hücrelerin, integrinlerin aktin filaman demetlerine bağlanması yoluyla hücre dışı matrise tutundukları bölgeler.

forbol esterleri Diaçilgliserol anoloğu olarak davranıp, protein kinaz C'yi uyaran bit tümör promotör grubu.

Fos Büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak aktifleşen bir proto-onkogen tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörü.

fosfatidiletanolamin Baş grubu etanolaminden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfatidilinositid 3-kinaz (PI3-kinaz) PIP_2'yi fosfatlayarak, ikincil mesajcı fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatı (PIP_3) oluşturan enzim.

fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfat (PIP_3) PIP_2'nin fosforillenmesiyle oluşan bir ikincil mesajcı.

fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfat (PIP_2) Plazma zarının iç tabakasının minör fosfolipid bileşeni. Hormonlar ve büyüme faktörleriyle uyarılan fosfolipaz C tarafından hidrolize edilir ve ikincil mesajcılar; diaçilgliserol ile inositol trifosfat oluşur.

fosfatidilkolin Baş grubu kolinden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfatidilserin Baş grubu serinden oluşan bir gliserol fosfolipid.

fosfodiester bağı Bir nükleotidin 5'-fosfatı ile diğerinin 3'-hidroksili arasındaki bağ.

fosfolipaz C Diaçilgliserol ve inositol trifosfat ikincil mesajcılarını oluşturmak üzere, PIP_2'yi hidrolize eden enzim.

fosfolipid çift tabaka Biyolojik zarların temel yapısıdır; fosfolipidler, hidrofobik kuyrukları zar içerisine gömülü, hidrofilik baş grupları ise her iki yanda sulu ortama açık olarak yerleşmiştir.

fosfolipid taşıyıcı protein Hücre zarları arasında fosfolipidleri taşıyan protein.

fosfolipidler Hücre zarlarının esas bileşenidir, fosfat içeren bir polar baş grubuna bağlı iki hidrokarbon zincirinden (genellikle yağ asidi) oluşur.

fosforillenme Bir moleküle fosfat grubu eklenmesi.

fotoreaktivasyon Pirimidin dimerlerini ayırmak için güneş enerjisinin kullanıldığı DNA onarım mekanizması.

fotosentetik pigmentler Fotonları soğurarak güneş ışığının enerjisini yakalayan pigmentler.

fotosentez Hücrelerin, güneş ışığı enerjisinden yararlanarak CO_2 ve sudan glukoz sentezleme süreci.

fotosistem I Tilakoid zarda bulunan ve güneş ışığından elde edilen enerjiyi NADPH sentezlemek için kullanan protein kompleks.

fotosistem II Tilakoid zarda bulunan ve güneş ışığından elde edilen enerjiyi ATP sentezlemek için kullanan protein kompleks.

G proteini Guanin nükleotid bağlanmasıyla denetlenen bir hücre sinyal iletim proteinleri ailesi.

G proteinleri- eşlikli reseptörler Zarı yedi kez kat eden α heliks yapılarıyla tanınan bir reseptör. Ligand bağlanması, G proteinini aktifleştiren konformasyonel değişikliğe neden olur.

G_0 Hücrelerin metabolik aktivite gösterdikleri ancak çoğalmadıkları, devinimsiz dönem.

G_1 evresi. Hücre döngüsünün, mitozun sonu ile DNA sentezi başlangıcı arasındaki evresi.

G_1 siklinler (Cln'ler) START'dan geçmeyi sağlayan maya siklinleri.

G_2 evresi Hücre döngüsünün, S evresinin sonu ile mitozun başlangıcı arasındaki evresi.

geçici ekspresyon Kültür hücrelerine verilen ve genoma katılmayan plazmid DNA'ların ekspresyonu.

geçiş durumu Bir enzimatik reaksiyon sürecinde sübstratların geçmesi gereken bir yüksek enerji durumu.

gen Bir polipeptid zinciri ya da bir RNA molekülü kodlayan DNA bölümü.

gen ailesi Ortak atasal genin duplikasyonu ile türemiş benzer genler grubu.

gen amplifikasyonu Bir DNA bölgesinin tekrarlayan replikasyonu sonucunda bir genin kopya sayısının artması.

genel homolog rekombinasyon Büyük oranda dizi benzerliği (homoloji) içeren DNA molekülleri arasında parça değiş tokuşu.

genel transkripsiyon faktörleri Genel transkripsiyon mekanizmasında yer alan transkripsiyon faktörleri.

genetik kod (şifre) Nükleotid üçlüleri ile proteindeki amino asitler arasındaki anlam uyumu.

genom kütüphanesi Bir canlının genomunun tümünü, rekombinant DNA klonları halinde kapsayan koleksiyon.

genomik damgalanma Ekspresyonu anneden ya da babadan kalıtılmış olmasına bağlı olan genlerin, görünüşe göre, DNA metilasyonu ile regülasyonu.

genotip Bir canlının genetik bileşimi.

geriye tepki (feedback) inhibisyonu Bir metabolik yolak ürününün, kendi sentezinde rol alan bir enzimin aktivitesini engellediği bir allosterik regülasyon tipi.

Gibbs serbest enerjisi (G) Kimyasal bir tepkimenin enerjetik olarak uygun yönünü belirlemek üzere entalpi ve entropi etkilerini birleştiren bir termodinami fonksiyonu.

giberellin Bir bitki hormonu.

glikojen Hayvanlarda başlıca karbohidrat depo şekli olan glukoz polimeri.

glikokaliks Hücre yüzeyini kaplayan karbohidrat kılıf.

glikolipid Karbohidrat içeren bir polar baş kısmına bağlı iki hidrokarbon zincirinden oluşan lipid.

glikoliz Glukozun anaerobik yıkımı.

glikoprotein oligosakkaridlere bağlı protein.

glikozaminoglikan (GAG) Hücre dışı matriste bulunan ve jel oluşturan bir polisakkarid.

glikozidik bağ Oligosakkarid ya da polisakkaridlerde şeker birimleri arasında oluşan bağ.

glikozillenme Proteinlere karbohidrat eklenmesi.

glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası Proteinleri plazma zarının dış yüzeyine sabitleyen, fosfatidilinositol içerikli glikolipidler.

glioksalat döngüsü Bitkilerde yağ asitlerinin karbohidratlara dönüşümü.

glioksizom İçerisinde glioksalat döngüsünün yer aldığı peroksizomlar.

gliserol fosfolipidler Gliserol molekülüne bağlı iki yağ asidinden oluşan fosfolipidler.

globuler (G) aktin Filaman yapısına katılmamış aktin monomerleri.

glukokortikoid Adrenal bezi tarafından üretilen ve glukoz yapımını uyaran bir steroid.

glukoneogenez Glukoz sentezi.

Golgi aygıtı Protein ve lipidlerin işlenmesinde ve dağıtımında görevli bir sitoplazmik organel. Bitki hücrelerinde, aynı zamanda hücre duvarı polisakkaridlerinin sentezlendiği yer.

Golgi kümesi Golgi aygıtının, metabolik aktivitelerin büyük bölümünün gerçekleştiği bölmeleri.

granülositler Yangı reaksiyonlarında rol oynayan kan hücreleri.

GTPaz-aktifleyici proteinler Küçük GTP-bağlayan proteinler tarafından GTP'nin hidrolizini uyaran proteinler.

guanilil siklaz GTP'den siklik GMP oluşumunu katalizleyen enzim.

guanin Sitozin ile eşleşen pürin.

güçlendirici (enhancer) Promotörden uzak bir konumda yerleşik olabilen, transkripsiyon düzenleyici dizin.

haploid Her kromozomun tek kopyasına sahip hücre veya canlı.

hata-eğilimli onarım Özel DNA polimerazların hasarlı DNA bölgesini replike ettikleri bir onarım şekli.

helikaz DNA sarmalının açılmasını katalizleyen enzim.

hemidesmozom Hücrelerle hücre dışı matris arasında, keratin ipliklerinin integrinlere tutunduğu temas noktası.

hemisellüloz Bitki hücre duvarında selüloz mikrofibrillerini birbirine bağlayan bir polisakkarid.

hepatit B virusları Karaciğer hücrelerini enfekte eden ve karaciğer kanseri gelişmesine neden olabilen bir DNA virus ailesi.

hepatit C virusları Karaciğer hücrelerini enfekte eden ve karaciğer kanseri gelişmesine neden olabilen bir RNA virus ailesi.

herpesviruslar Bazı üyeleri kanseri indükleyen bir DNA virus ailesi.

heterofilik etkileşim Farklı tipte iki adezyon molekülü arasındaki bağlantı.

heterokromatin Yoğun, transkripsiyona kapalı kromatin.

heterotrimerik G proteini Guanin nükleotid bağlayan, üç alt birimden oluşmuş bir protein.

hız santrifügasyonu Partiküllerin çökme hızlarına göre ayrılması.

hidrofilik Suda çözünür.

hidrofobik Suda çözünmez.

histon asetillenmesi Histonların, özgül lizin birimlerine asetil grupları eklenerek değiştirilmesi.

histon kodu Kromatinin transkripsiyon aktivitesini düzenlediği düşünülen özgül histon modifikasyonlarının bileşimi.

histonlar Ökaryot kromozomlarında DNA'yı paketleyen proteinler.

HMGN proteinleri Gevşek, transkripsiyon yönünden aktif kromozom bölgelerinde bulunan histon dışı (nonhiston) kromozomal proteinler.

Holliday kavşağı İki DNA molekülünün iplikleri arasında homolog baz eşleşmesiyle oluşan çapraz-iplik yapısındaki rekombinasyon ara ürünü.

Holliday modeli Heterodupleks bölgelerin oluşumuyla ilgili genetik rekombinasyon modeli.

homeokutu Homeodomeyn'leri kodlayan, 180 baz çifti uzunlukta, korunmuş DNA dizileri.

homeodomeyn Embriyonik gelişim sürecinde gen ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinde bulunan bir tip DNA bağlanma bölgesi.

homofilik etkileşim Aynı tip adezyon molekülleri arasındaki etkileşim.

homolog rekombinasyon Benzer nükleotid dizilerine sahip DNA bölgeleri arasındaki rekombinasyon.

hormonlar Endokrin bezlerinden üretilen ve vücudun uzak bölgelerindeki hücreleri etkileyen sinyal molekülleri.

hücre adezyon molekülleri Hücre-hücre etkileşimlerini sağlayan, transmembran proteinler.

hücre dışı matris Hücreler arası alanları dolduran ve hücreleri ve dokuları birbirine bağlayan, salgılanmış protein ve polisakkaridler.

hücre döngüsü kontrol noktaları Hücre döngüsünde bir evredeki olaylar tamamlanmadan bir sonraki evreye geçişi önleyen denetim mekanizmaları.

hücre duvarı Bakteri, mantar ve bitki hücreleri dışında bir tabaka oluşturarak yapısal destek sağlayan, sert ve gözenekli yapı.

hücre hatları Kültürde sonsuz çoğalabilen hücreler.

hücre içi sinyal iletimi Kimyasal sinyalleri hücre yüzeyinden hücre içi hedeflere ileten reaksiyonlar zinciri.

hücre iskeleti Ökaryot hücrelerde sitoplazmanın her yanına uzanan protein filamanlar ağı. Hücrenin çatısını oluşturur ve hücre hareketinden sorumludur.

hücre korteksi Plazma zarının altını kaplayan aktin ağı.

hücre plakası Yüksek bitkilerde sitokinez sırasında, yeni hücre duvarlarını oluşturacak olan, zarla kaplı disk şeklindeki yapı.

hücre transformasyonu Kültürdeki normal hücrelerin kanser hücresine dönüşmesi.

ısı-şok proteinleri Yüksek sıcaklık veya diğer çevresel stres durumlarında, hücreler tarafından üretilen, yüksek oranda korunmuş şaperon proteinler.

ışık reaksiyonları Güneş enerjisinin ATP ve NADPH üretiminde kullanıldığı fotosentez reaksiyonları.

ikinci mesajcı Ligand-reseptör bağlantısının sonucunda metabolizması değişen, diğer hücre içi süreçleri düzenleyerek bir sinyal iletici görevi yapan bileşik.

ikincil hücre duvarı Bölünmesi duran bitki hücrelerinde plazma zarı ile ilk hücre duvarı arasına yerleşen, kalın hücre duvarı.

ikincil yapı Amino asitlerin, belirli polipeptid bölgelerindeki düzenli aranjmanı. bkz. α-sarmal ve β-tabakası.

immünblot SDS- poliakrilamid jel ile ayrılan proteinleri saptamak için antikor kullanılan bir yöntem.

immünglobulin bkz. antikor.

immünglobulin (Ig) süper ailesi immünglobulinlere benzer yapısal bölgeler içeren hücre adezyon molekül ailesi.

immün çöktürme Antikorlar kullanılarak proteinlerin izolasyonu.

importin Nükleer yerleşim sinyallerini tanıyarak çekirdek içerisine geçişi yöneten bir karyoferin.

***in situ* hibridizasyon** Hücre bütününde ya da kromozomlarda RNA veya DNA dizilerini belirlemek amacıyla radyoaktif veya floresan prob kullanılması.

***in vitro* mutagenez** Klonlanmış DNA'da *in vitro* koşulda mutasyon oluşturmak.

***in vitro* translasyon** Hücre- içermeyen özütle protein sentezi.

indüklenmiş uyum Sübstrat bağlanınca, hem enzimin hem de sübstratın konfigürasyon değiştirdiği enzim etki modeli.

inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) PIP_2 hidroliziyle oluşan ve endoplazmik retikulumdan kalsiyumun salınmasını uyaran bir ikincil mesajcı.

integral zar proteinleri Hücre zarlarında lipid çift tabaka içerisine gömülü proteinler.

integrin Hücreleri hücre dışı matrise yapışmasını sağlayan transmembran protein.

interfaz Hücre döngüsünde; G_1, S ve G_2 evrelerini kapsayan, mitozlar arası dönem.

intron Gen içinde eksonları birbirinden ayıran, kodlamayan diziler.

işlenmiş psödogen Mesajcı RNA'nın ters transkripsiyonu ile oluşan bir psödogen.

iyon kanalı Fosfolipid çift tabakada açık geçitler oluşturarak, iyonların zardan kolayca geçmesini sağlayan proteinler.

iyon pompası ATP hidroliziyle iyonların zardan geçişini düzenleyen protein.

JAK/STAT yolağı STAT transkripsiyon faktörlerinin, JAK protein kinaz ailesi üyeleri tarafından fosfatlanarak aktive edildiği bir sinyal iletim yolağı.

Janus kinaz (JAK) Sitokin reseptörleriyle birlikte çalışan, reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar ailesi.

jel elektroforezi Moleküllerin, bir elektrik alanındaki hareket özelliklerine göre ayrılmalarını sağlayan yöntem.

Jun Bir proto-onkogenden kodlanan ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak aktifleşen bir transkripsiyon faktörü.

kaba endoplazmik retikulum (ER) Ribozomlarla kaplı olan ve protein metabolizmasıyla yükümlü olan endoplazmik retikulum bölgesi.

kaderinler Aterens bağlantılarda ve desmozomlarda, sağlam hücre-hücre bağlantıları oluşturan, bir hücre adezyon molekül grubu.

kallus Kültürdeki, farklılaşmamış bitki hücre kümesi.

kalmodulin Kalsiyum bağlayan bir protein.

kamçı Plazma zarının, hücre hareketiyle görevli, mikrotübül-içerikli uzantısı.

kanal proteinleri Bir zarın içerisinde geçit oluşturan proteinler.

kanser Malin tümör.

Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirus Kaposi sarkomu nedeni olan insan herpesvirusu.

karanlık reaksiyonlar Fotosentez sırasında, karbondioksit ve suyu karbohidratlara dönüştüren bir dizi reaksiyon. bkz. Calvin döngüsü.

karbohidrat $(CH_2O)n$ formülüne sahip molekül. Karbohidratlar, basit şekerleri ve polisakkaridleri kapsar.

kardiyolipin Dört hidrokarbon zincirli bir fosfolipid.

karsinojen Kansere neden olan etmen.

karsinom Epitel hücrelerinin kanseri.

karyoferin Bir nükleer taşıma reseptörü.

kas lifleri (fiberler) Gelişim sürecinde çok sayıda hücrenin birleşmesiyle oluşan, büyük, iskelet kası hücreleri.

kasılan demetler Miyozin II ile etkileşen ve kasılma yetisi bulunan aktin filaman demetleri.

kasılan halka Mitoz sırasında plazma zarının altında oluşan ve sitokinezi sağlayan, aktin ve miyozin II içeren yapı.

kaspazlar Programlanmış hücre ölümüne yol açan bir proteaz ailesi.

katalaz Hidrojen peroksidi ayrıştıran enzim.

kaveola Endositozla ilişkili olabileceği düşünülen, küçük plazma zarı girintileri.

kayan filaman modeli Aktin ve miyozin filamanlarının birbiri üzerinde kayması sonucu kasılma şeklinde görülen kas kasılma modeli.

kemiozmotik eşlenme Zarın iki yanındaki proton gradientinde tutulan enerjiyle ATP oluşturulması.

kendi-kesip ekleyen (self-splicing) Bazı RNA'ların kendi intronlarının uzaklaştırılmasını katalizleme yetisi.

keratin Epitel hücrelerinde bulunan bir ara filaman çeşidi.

kilobaz (kb) Bin nükleotid ya da nükleotid baz çifti.

kinetokor Sentromere bağlanan proteinlerden oluşan ve kromozomların mitoz iğine bağlanmasını ve hareketlerini sağlayan özelleşmiş yapı.

kinetokor mikrotübülleri Yoğunlaşmış kromozomlara sentromerlerinden bağlanan mitoz iği mikrotübülleri.

kinezin Mikrotübüller üzerinde artı uca doğru hareket eden motor proteini.

kirpik Hücreyi sıvı içerisinde ya da sıvıyı hücre üzerinde hareket ettiren, mikrotübül-tabanlı plazma zarı çıkıntısı.

kitin Mantar hücre duvarının ana bileşeni olan bir N-asetilglukozamin polimeri.

kiyazma Mayoz sırasında homolog kromozomları birbirine bağlayan Rekombinasyon bölgeleri.

klatrin Hücre zarlarının sitoplazmik yüzeyini kaplayan ve vezikül tomurcuklanmasını başlatmak üzere, sepete benzer kafesler şeklinde birleşen bir protein.

klatrin-kaplı çukur Endositozla içeri alınacak makro moleküllerin reseptörlerini içeren, plazma zarı özel bölümü.

klatrin-kaplı vezikül Klatrinle kaplı bir taşıma keseciği.

klorofil Bitki hücrelerinin temel fotosentez pigmenti.

kloroplast Bitki hücrelerinde ve yeşil alglerde fotosentezden sorumlu organel.

kodon Genetik şifrenin temel birimi, bir amino asit şifreleyen veya durma dizini şeklindeki 64 nükleotid üçlüsünden her biri.

koenzim A (CoA) Metabolik tepkimelerde asetil grubu taşıyıcısı olarak görev yapan bir koenzim.

koenzim Q Mitokondri elektron taşıma sisteminde, protein kompleksler arasında elektron taşıyan, küçük, yağda çözünen bir molekül.

koenzimler Biyolojik reaksiyonları katalizleyen enzimlerle birlikte çalışan, düşük molekül ağırlıklı organik moleküller.

kohesinler Kardeş kromatidler arasındaki bağlantının sürekliliğini sağlayan bir protein kompleksi.

kolaylaştırılmış difüzyon Moleküllerin taşıyıcı ya da kanallar vasıtasıyla zardan geçmesi.

kolçisin Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.

kollenkin Bitkiye yapısal destek sağlayan, kalın hücre duvarları ile özelleşmiş bitki hücreleri.

kolesterol Dört hidrokarbon halkasından oluşan bir lipid. Kolesterol, hayvan hücresi plazma zarlarının majör bir bileşeni ve steroid hormonların öncülüdür.

kollajen lifler Kollajen moleküllerinin düzenli olarak yalpalar tarzda bir araya gelmesiyle oluşan fibrillerdir.

kollajen Hücre dışı matrisin başlıca yapısal proteini.

kolsemid Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.

konfokal mikroskopi Yüksek kontrast ve detayda görüntüler elde etmek için, floresans mikroskobu ile bir elektronik görüntü analizleyicinin birleştirildiği, bir mikroskpi şekli.

konneksin Aralık bağlantıları oluşturan transmembran proteinler ailesinin bir üyesi.

kontakt inhibisyon Hücre-hücre dokunuşu sonucunda, normal hücrelerin çoğalmasının veya hareketlerinin engellenmesi.

koreseptör (eşbaskılayıcı) Baskılayıcılarla birlikte, genellikle kromatin yapısını değiştirerek, gen ifadelenmesini engelleyen protein.

kortikosteroidler Adrenal bezinin ürettiği steroid hormonlar.

kozmid Bakteriyofaj λ dizileri, antibiyotik direnç dizileri ve bir replikasyon orijinine sahip vektör. 45kb'ye kadar büyük DNA eklentilerini barındırabilir.

kök hücre Farklılaşabilen ya da kök hücre olarak kalan yavru hücreler oluşturmak üzere bölünen hücre.

Krebs döngüsü bkz. sitrik asit döngüsü.

krista İç mitokondri zarının, matriks içine doğru uzayan kıvrımı.

kromatin Ökaryot DNA'sı ile histonlardan oluşan ipliksi kompleks. bkz. histonlar, nükleozom ve kromatozom.

kromatozom Bir histon koru çevresine dolanmış 166 baz çifti uzunlukta DNA ve bunları tutan bir bağlayıcı histondan oluşan kromatin alt birimi.

kromoplast Karotenoidler içeren plastid.

kromozomlar Uzun DNA molekülleri ile, birleşik proteinlerden oluşan gen taşıyıcılar.

küçük nükleer ribonükleoprotein partikülleri (snRNP'ler) snRNA'ların proteinlerle oluşturdukları kompleks.

küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) Büyüklükleri 50 ila 200 baz arasında değişen nükleer RNA'lar.

küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) Nükleolus bölgesinde bulunan ve pre-rRNA işlenmesinde rol oynayan küçük RNA'lar.

küçük, GTP-bağlayan proteinler Ras, Rab, Rho ve Ran proteinlerinin de içinde bulunduğu, büyük, monomer şeklinde GTP-bağlayan proteinler ailesi.

lamellipod Fibroblast hareketiyle ilişkili olan, plazma zarının dışa doğru yaptığı aktin-içerikli, geniş uzantı.

laminin Bazal laminanın başlıca adezyon proteini.

laminler Nükleer laminayı oluşturan intermedyer filaman proteini.

lenfoma Lenfoid hücre kanseri.

lenfosit Bağışıklık yanıtında görevli bir kan hücresi. B lenfositler antikorları üretir ve T lenfositler hücresel bağışık yanıttan sorumludur.

leptoten Mayoz I'in uzun profaz evresinde, eş kromozomların yoğunlaşma öncesi eşleştikleri başlangıç aşaması.

LINE'ler (uzun, serpiştirilmiş elemanlar) Memeli genomlarında yüksek düzeyde tekrarlanan bir retrotranspozon ailesi.

ligand Reseptöre bağlanan molekül.

ligand-kapılı kanallar Sinyal moleküllerinin bağlanmasına yanıt olarak açılan iyon kanalları.

lignin İkincil hücre duvarlarını güçlendiren, fenol birimlerinden oluşan polimer.

lipidler Enerji depo molekülleri, sinyal molekülleri ve plazma zarlarının ana bileşeni olarak görev üstlenen hidrofobik moleküller.

lipozom DNA'yı memeli hücrelerine sunma amacıyla kullanılan lipid kesecik.

lizojeni İnaktif viral DNA kopyasının hücre genomuna katılımına yol açan bir viral enfeksiyon.

lizozom Biyolojik polimerleri yıkan enzimler içeren bir sitoplazmik organel.

lizozomal depo hastalıkları Etkilenen bireylerin lizozomlarında yıkılmamış madde birikimi ile karakterize bir hastalık grubu.

lökoplast Fotosentez yapmayan bitki dokularında enerji kaynaklarını depolayan bir plastid.

lökotrien Araşidonik asitten sentezlenen bir ekosanoid.

lösemi Dolaşımdaki kan hücrelerinin öncülerinden köken alan kanser.

lösin fermuarı Bir çok transkripsiyon faktöründe görülen, tekrarlayan lösin birimlerine sahip protein dimerleşme bölgesi.

M evresi Hücre döngüsünün mitoz evresi.

makrofaj Fagositoz için özelleşmiş bir beyaz kan hücresi.

makropinositoz Sıvıların büyük veziküller(kesecikler) içerisinde alınması.

malin tümör Normal dokuya sızan ve tüm vücuda yayılan tümör.

MAP kinaz Hücre çoğalması ve farklılaşmasında yaygın regülatör etkiye sahip bir, mitojen tarafından aktive edilen protein-serin / treonin kinaz ailesi.

matriks Mitokondri iç alanı.

matriks işlemci peptidazı (MPP) Mitokondri matriksine alınan proteinlerin öncül dizilerini kesen proteaz.

maya yapay kromozomu (YAC) Maya hücrelerinde bir kromozom olarak replike olabilen ve oldukça büyük DNA eklentilerini (yüzlerce kb) barındırabilen bir vektör.

mayalar En basit tek hücreli ökaryot. Mayalar, ökaryot hücrelerin araştırılması için önemli örneklerdir.

mayoz Diploid hücrelerin, ardışık iki nükleer ve hücresel bölünmeyi kapsayan süreçle haploid yavru hücrelere bölünmesi.

megabaz (Mb) Bir milyon nükleotid veya nükleotid baz çifti.

mesajcı RNA (mRNA) Protein sentezine kalıplık yapan bir RNA molekülü.

metafaz Kromozomların, hücrenin merkezindeki bir metafaz plağına dizildikleri mitoz evresi.

metal gölgeleme Bir örneğin yüzeyinin ince buharlaştırılmış metal ile kaplanmasına dayalı bir elektron mikroskopi yöntemi.

metastaz Kanser hücrelerinin, kan veya lenfatik sistem yoluyla, diğer organlara yayılması.

7-metilguanozin başlık GTP ile metilenmiş şekerlerden oluşan ve ökaryot mRNA'larının 5' ucuna eklenen yapı.

mezoderm Orta germ tabakası; bağ dokularını ve hematopoyetik sistemi doğurur.

mikrodiken bkz. filopodyum.

mikrofilaman Aktinden oluşan bir hücre iskelet filamanı.

mikrotübül Tübülinlerin polimerleşmesiyle oluşan, sert, yaklaşık 25 nm çapında, ortası oyuk çubuk şeklindeki hücre iskelet bileşeni.

mikrotübül-düzenleme merkezi Hücrenin merkezine yakın noktada bulunan, mikrotübüllerin dışarı doğru uzandıkları bir tutunma noktası.

mikrotübülle-ilişkili proteinler (MAP lar) Mikrotübüllere bağlanarak dayanıklılıklarını değiştiren proteinler.

mikrovilus Özellikle absorbsiyon yapan hücrelerin yüzeyinde çok miktarda bulunan, aktin-tabanlı plazma zar uzantıları.

mikrozom Hücreler parçalanınca ortaya çıkan, endoplazmik retikulumdan türemiş küçük vezikül.

mineralokortikoidler Adrenal bezi tarafından üretilen ve böbreği etkileyerek tuz-su dengesini düzenleyen steroid hormonlar.

mitokondriler Ökaryot hücrelerde, oksidatif fosforilasyonla ATP'lerin büyük kısmının sentezinden sorumlu sitoplazmik organeller.

mitotik iğ Mitoz sırasında yavru kromozomların birbirinden ayrılmasını sağlayan, iğ kutuplarından çıkan mikrotübül dizisi. Ayrıca; kinetokor mikrotübülleri, kutup mikrotübülleri ve yıldızsı mikrotübüllere de bakınız.

mitoz Çekirdek bölünmesi.

miyofibril Kas hücrelerindeki aktin ve miyozin filaman demetleri.

miyozin Bir moleküler motor olarak aktin ile etkileşen protein.

miyozin hafif-zincir kinaz Regülatör hafif zincirini fosfatlayarak miyozin II'yi aktive eden protein kinaz.

miyozin I Aktin filamanları üzerinde kargo taşıyan bir tip miyozin.

miyozin II Aktin filamanlarını kaydırarak kasılma gerçekleştiren miyozin tipi.

moleküler klon bkz. rekombinant molekül.

moleküler klonlama İlgilenilen bir DNA fragmanının, konakçı hücrede bağımsız replike olabilen bir DNA molekülüne (vektör) eklenmesi.

moleküler motor Kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürerek, güç ve hareket üreten protein.

monoklonal antikor B lenfositlerin bir klonal hattı tarafından üretilen antikor.

monosakkaridler $(CH_2O)n$ temel formülüne sahip basit şekerler.

monosistronik Tek bir polipeptid zincirini kodlayan mesajcı RNA.

monosit Yangısal reaksiyonlarda görevli bir kan hücresi tipi.

Mos Mayoz I'den mayoz II'ye geçiş için ve omurgalı oositlerinin metafaz II'de tutulması için gerekli olan bir protein kinaz.

multi-foton eksitasyon mikroskopisi Örneğin, floresan boyanın uyarılması için iki ya da daha fazla fotonun absorplanmasını gerektirecek şekilde bir dalga boyunda ışıkla ışınlandığı bir floresan mikroskopi tarzı.

mutajen Yüksek sıklıkta mutasyona neden olan kimyasal.

mutasyon Genetik değişiklik.

Na^+-K^+ ATPaz Bkz. Na^+-K^+ pompası.

Na^+-K^+ pompası Na^+'u hücre dışına ve K^+'u hücre içine aktaran bir iyon pompası.

NADP redüktaz Elektronları ferrodoksinden $NADP^+$'ye aktararak NADPH üreten enzim.

nebulin Kas hücrelerinde aktin filamanlarının boyunu düzenleyen protein.

neksin Aksonemde mikrotübül çiftlerini birbirine bağlayan bir protein.

Nernst eşitliği İyon konsantrasyonu ile zar potansiyeli arasındaki ilişki.

nidojen bkz. entaktin.

nikotinamid-adenin dinükleotid (NAD^+) Yükseltgenme / indirgenme reaksiyonlarında elektron taşıyıcı olarak görev yapan bir koenzim.

nişasta Bitkilerde başlıca karbohidrat depo şekli olan glukoz polimeri.

N-miristoillenme Bir polipeptid zincirinde N-ucu glisin birimine miristik asit (14 karbonlu bir yağ asidi) eklenmesi.

N-*myc* Bir transkripsiyon faktörü kodlayan ve genellikle nöroblastomlarda amplifikasyonla aktive olan bir proto-onkogen.

Northern blot Mesajcı RNA'ların jel elektroforezi ile ayrılmasını takiben, özgül problarla hibridize edilerek tanımlandığı yöntem.

nörofilaman Sinir hücrelerinin aksonlarını destekleyen bir ara filaman tipi.

nörofilaman (NF) proteinleri Birçok olgun sinir hücresinde bulunan, majör ara filaman proteinleri.

nörohormon Nöronlardan salgılanan ve uzak hücreleri etkileyen peptidler.

nöron Tüm vücuttan uyarıları almak ve iletmek üzere özelleşmiş bir sinir hücresi.

nöropeptidler Nöronlardan salgılanan sinyal peptid molekülleri.

nörotransmiter Bir sinapsta, sinyalleri uyarılmış nörondan bir hedef hücreye taşıyan, küçük, hidrofilik molekül.

nörotrofin Nöron gelişimini ve yaşamını düzenleyen polipeptid ailesinin bir üyesi.

nükleer çıkış sinyali Proteinleri nükleustan sitozole geçmek üzere hedefleyen bir amino asit dizisi.

nükleer lamina Çekirdeğe yapısal destek sağlayan, lamin filamanlarından oluşmuş örgü.

nükleer por kompleksi Çekirdek zarfı içerisinde bir taşıma kanalı oluşturan, büyük yapı.

nükleer reseptör süper ailesi Steroid hormon, tiroid hormonu, retinoik asit ve vitamin D3 reseptörlerini içeren bir transkripsiyon faktörleri ailesi.

nükleer yerleşim sinyali Proteinleri sitoplazmadan çekirdeğe taşınmak üzere hedefleyen amino asit dizisi.

nükleik asit hibridizasyonu Komplementer baz eşleşmesi ile, çift sarmal DNA ve / veya RNA moleküllerinin oluşması.

nükleolus (çekirdekçik) Nükleusta rRNA sentez, işlenmesi ile ribozom kurulumunun yapıldığı bölge.

nükleolusu oluşturan bölge Ribozomal RNA genlerini içeren kromozom bölgeleri.

nükleotid Fosforillenmiş nükleozid.

nükleotid-çıkarma onarımı Hasarlı bazı içeren oligonükleotidlerin DNA yapısından çıkartıldığı DNA onarım mekanizması.

nükleozid Bir şekere (riboz veya deoksiriboz) bağlı pürin ya da pirimidin bazı.

nükleozom Bir histon çekirdeği etrafına sarılmış DNA'dan oluşan, kromatin temel yapı birimi.

nükleozom çekirdek partikülleri H2A,H2B,H3 ve H4 histonlarının her birinden ikişer tane içeren histon oktamerinin çevresine dolanmış 146 baz çiftlik DNA'dan oluşan partikül.

nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri Kromatin yapısını gevşeterek, transkripsiyon faktörlerinin nükleozomal DNA'ya bağlanmasına olanak sağlayan proteinler.

nükleus (çekirdek) Ökaryot hücrelerde, genetik materyali içeren, en önemli organel.

Okazaki fragmanları DNA'nın aksak ipliğini oluşturmak üzere birbirine bağlanan, kısa DNA parçaları.

oksidatif fosforilasyon Elektronların, elektron taşıma sisteminde son alıcı olarak moleküler oksijene, enerjetik yönden elverişli aktarımıyla eşlenen ADP'den ATP'nin sentezlenmesi.

oksidatif metabolizma Organik moleküllerin yıkımında moleküler oksijenin elektron alıcı olarak kullanılması.

oksin Bitki gelişiminin bir çok yönünü denetleyen bir bitki hormonu.

olgunlaşmayı sağlayan faktör (MPF) Mitoz ya da mayozun M evresine geçişi sağlayan, Cdc2 ile siklinB'den oluşan kompleks.

oligonükleotid Birkaç nükleotidden ibaret, kısa polimer.

oligosakkarid Birkaç şekerden ibaret, kısa polimer.

onkogen Kanser hücresinin bir ya da daha fazla özelliğinin nedeni olan gen.

operatör Bir operonun transkripsiyonunu denetleyen düzenleyici DNA dizisi.

operon Tek bir mRNA'ya kopyalanan bitişik genler grubu.

orijin replikasyon kompleksi (ORC) Ökaryot orijinlerinde DNA replikasyonunu başlatan protein kompleks.

orta lamella Bitki hücresi duvarında, bitişik hücreleri bir arada tutan yapıştırıcı görevi yapan bir bölge.

otofagozom Endoplazmik retikulumdan zar parçalarıyla kaplı, içsel organelleri kapsayan ve lizozomlarla birleşen bir vezikül.

otofaji Sitoplazmik proteinlerin ve organellerin, endoplazmik retikulumdan türeyen ve lizozomlarla birleşen veziküllere alınarak parçalanması.

otofosforillenme Bir protein kinazın kendi fosforillenmesni katalizlediği bir reaksiyon.

otokrin çoğalma uyarımı Hücre çoğalmasının, yanıt veren hücre tarafından üretilen büyüme faktörü ile uyarılması.

otokrin sinyal iletimi Hücrenin, kendi ürettiği büyüme faktörüne yanıt verdiği, bir hücre sinyal iletim türü.

otonom replike olan dizi (ARS) Mayada bulunan bir replikasyon orijini.

otoradyografi Radyoizotoplarla işaretlenmiş moleküllerin, X-ışın filmi ile saptanması.

öbakteriler İki büyük prokaryot grubundan, en bilinen bakteri türlerini de kapsayan biri.

ökaryot hücreler Nükleer zarfı, sitoplazmik organelleri ve hücre iskeleti bulunan hücreler.

ökosanoid Otokrin ve parakrin sinyal iletiminde görev alan, prostaglandinler, prostasiklinler, tromboksanlar ve lökotrienleri kapsayan lipid grubu.

ökromatin Yoğun olmayan, transkripsiyonel olarak aktif interfaz kromatini.

öncü iplik Replikasyon çatalıyla aynı yönde, kesintisiz sentezlenen DNA ipliği.

öncül hücre duvarı Bölünen bitki hücrelerinin duvarları.

östrojen yumurtalıklarda üretilen bir steroid hormon.

P1 yapay kromozomu (PAC) Uzun DNA parçalarının *E.coli*'de klonlanması için kullanılan bir vektör.

p53 DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü G1 evresinde durduran ve çeşitli uyaranlarla uyarılan apoptoz için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü (p53 tümör baskılayıcı geninden kodlanır).

pakiten Eş kromozomlar arasında rekombinasyonun gerçekleştiği mayoz I evresi.

palmitoillenme Bir polipeptid zincirindeki sisteine palmitik asit (16 karbonlu bir yağ asidi) eklenmesi.

papillomavirus İnsanlarda bazı tipleri servikal ve bazıları anogenital kanserlere neden olan DNA virusları ailesinin bir üyesi.

parakrin sinyal iletimi Bir hücreden salınan molekülün komşu hedef hücreleri etkilediği, hücreden hücreye lokal sinyal iletimi.

parankim hücresi Metabolik aktivitelerin çoğundan sorumlu olan bitki hücre tipi.

pasif taşınma Moleküllerin bir zardan, enerjetik olarak avantajlı yönde taşınması.

pasif difüzyon Küçük hidrofobik moleküllerin, fosfolipid çift tabaka içinden geçmesi.

pektin Bitki hücre duvarındaki bir, jel-oluşturan polisakkarid.

peptid bağı Polipeptid zincirlerinde amino asitleri birbirine bağlayan bağ.

peptid hormon Amino asitlerden oluşan sinyal molekülü.

peptidil prolil izomeraz Prolil peptid bağlarında *cis-trans* izomerleşmesini katalizleyerek, protein katlanmasını kolaylaştıran enzim.

peptidoglikan Kısa peptidlerle çapraz bağlanmış doğrusal polisakkarid zincirlerinden oluşan, bakteri duvarı ana bileşeni.

periferal zar proteinleri Hücre zarlarına, protein-protein ilişkileriyle, dolaylı olarak bağlanan proteinler.

peroksizom Oksidatif reaksiyonları yürütmek üzere özelleşmiş bir sitoplazmik organel.

pinositoz Hücre içerisine sıvıların ya da moleküllerin küçük veziküllerle alınması.

pirimidin dimeri UV ışınının neden olduğu, bitişik pirimidinlerin bağlanarak dimer oluşturdukları, sık görülen bir DNA hasarı.

plakin Ara filamanları diğer hücre yapılarına bağlayan protein ailesinin bir üyesi.

plastidler Kloroplastları, kromoplastları, lökoplastları, amiloplastları ve elayoplastları içeren bitki organelleri ailesi.

platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) Kan pıhtılaşması sırasında, fibroblastların çoğalmasını başlatmak üzere trombositlerden salgılanan bir büyüme faktörü.

plazma zarı Hücreyi çevreleyen, protein içeren fosfolipid çift tabaka.

plazmalojenler Bir eter ve bir ester bağı içeren fosfolipid ailesi.

plazmid Konakçı hücrede bağımsız replike olabilen küçük, çembersel DNA molekülü.

plazmodesma Bitişik bitki hücreleri arasında, aralıksız plazma zar bölgesinin oluşturduğu sitoplazmik bağlantı.

PML / RARα Akut promiyelositik lösemide retinoik asit reseptörünün translokasyonuyla oluşan bir onkogen.

polar cisim Oosit mayozunu takiben, asimetrik hücre bölünmesiyle oluşan küçük hücre.

polar mikrotübüller Mitoz iğinde, hücrenin merkezinde üst üste binen ve iğin kutuplarını iterek uzaklaştıran mikrotübüller.

poli-A kuyruğu Ökaryot mRNA'larının 3' ucuna eklenmiş, yaklaşık 200 adenin nükleotidlik dizi.

poliadenillenme Bir pre-mRNA'ya poli-A kuyruğu takma işlemi.

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Bir DNA bölgesinin, *in vitro* ortamda tekrarlanan DNA replikasyon döngüleriyle amplifikasyonu yöntemi.

polinükleotid Milyonlarca nükleotid içeren bir polimer.

polip Bir epitel yüzeyinden çıkan selim bir tümör.

polipeptid Amino asit polimeri.

polisakkarid Yüzlerce ya da binlerce şeker içeren polimer.

polisistronik Çok sayıda polipeptid zinciri kodlayan mRNA'lar.

politen kromozom *Drosophila*'nın bazı dokularında görülen, DNA ipliklerinin art arda replike olup birbirinden ayrılamamasıyla ortaya çıkan dev bir kromozom.

polizom Bir mesajcı RNA'yı proteine çeviren ribozomlar dizisi.

polyomavirus Yaygın-çalışılan DNA tümör virusu.

porin Zarları β-fıçıları şeklinde kat eden ve bazı bakterilerin, mitokondrilerin ve kloroplastların dış zarlarında kanallar oluşturan protein grubunun bir üyesi.

pre-mRNA Ökaryot hücrelerde işlenerek, mesajcı RNA'ları oluşturan öncül transkript.

prenillenme Polipeptid zincirinin C ucu sistein birimlerine özel tip lipidlerin (prenil grupları) eklenmesi.

pre-rRNA Kesilerek her bir ribozomal RNA'yı (ökaryot; 28S, 18S ve 5.8S rRNA'ları) oluşturan öncül transkript.

pre-tRNA Taşıyıcı RNA'ları oluşturmak üzere kesilen öncül transkript.

primaz DNA sentezinin başlatılmasında kullanılan bir RNA polimeraz.

primer kültürler Bir doku kullanılarak hazırlanan hücre kültürleri.

prob Özgül bir nükleik asidi ya da proteini seçici olarak saptayabilen bir ayıraç.

profaz Mitozda, yoğunlaşmış kromozomların belirmesi ve mitotik iğin oluşması ile belirlenen başlangıç evresi.

profilin Aktin monomerlerinin filamanları oluşturmak üzere bir araya gelmelerine aracılık eden bir aktine-bağlanan protein.

progesteron Yumurtalıklarda üretilen bir steroid hormon.

programlı hücre ölümü Apoptoz olarak tanımlanan, normal fizyolojik hücre ölüm tarzı.

prokaryot hücreler Nükleer zarfı, sitoplazmik organelleri ve hücre iskeleti bulunmayan hücreler (bakteriler).

prokollajenler Fibril-oluşturan kollajenlerin çözünür öncülleri.

prometafaz Profaz ile metafaz arasında, mitoz iği mikrotübüllerinin kinetokorlara tutunduğu ve kromozomların, hücrenin merkezinde dizilmek üzere karıştıkları, geçiş dönemi.

promotör RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere bağlandığı DNA dizisi.

pronükleus Yeni döllenen yumurtadaki iki haploid çekirdek.

prostaglandin Yangı sinyali iletimiyle ilişkili bir ekosanoid lipid ailesi.

prostasiklin Prostaglandin H_2 den oluşan bir ekosanoid.

prostetik gruplar Proteinlere bağlı küçük moleküller.

proteazom Ubikütin ile belirlenmiş proteinleri yıkan, büyük proteaz kompleksi.

protein disülfid izomeraz Disülfid bağlantılarının oluşmasını ve kırılmasını katalizleyen enzim.

protein fosfataz Fosfatlanmış amino asit birimlerinden fosfat gruplarını uzaklaştırarak, protein kinazların etkisini geri dönüştüren enzim.

protein kinaz ATP'den bir fosfat grubu transfer ederek proteinleri fosfatlayan enzim.

protein kinaz A Siklik AMP tarafından düzenlenen bir protein kinaz.

protein kinaz C Diaçilgliserol ve Ca^{2+} tarafından aktive edilerek hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan bir protein-serin /treonin kinaz ailesi.

proteine çevrilmeyen 3' bölgesi Mesajcı RNA'nın 3' ucundaki kodlamayan bölge.

proteine çevrilmeyen 5' bölgesi Mesajcı RNA'nın 5' ucundaki kodlamayan bölge.

proteine çevrim (translasyon) Bir mRNA kalıbından polipeptid zinciri sentezi.

proteinler Kendine has amino asit dizisine sahip polipeptidler.

protein-serin /treonin kinaz Serin ve treonin birimlerini fosfatlayan bir protein kinaz.

protein-tirozin fosfataz Fosfotirozin birimlerinden fosfat grubunu uzaklaştıran enzim.

protein-tirozin kinaz Tirozin birimlerini fosfatlayan bir protein kinaz.

proteoglikan Glikozaminoglikanlara bağlı protein.

proteoliz Polipeptid zincirlerinin yıkımı.

proto-onkogen Bir onkogene dönüştürülebilen normal hücresel gen.

psödogen İşlevsiz gen kopyası.

psödopod Fagositozla ve amipsi hareketle yükümlü, aktin-temelli plazma zarı uzantısı.

PTB bölgesi Fosfotirozin içeren peptidleri bağlayan bir protein işlevsel bölgesi.

PTEN PIP3'ü defosforile eden ve tümör baskılayıcı olarak davranan bir lipid fosfataz.

Rab Vezikül taşınımında anahtar rol oynayan, küçük, GTP-bağlayan proteinler ailesi.

Rac Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde görevli, küçük bir GTP-bağlayan protein.

Raf Ras tarafından aktive edilen ve ERK MAP kinazın aktivasyonuna yol açan bir protein-serin / treonin kinaz (*raf* onkogeni tarafından kodlanır).

Ran Nükleer iç alım ve dışarı gönderme işlemlerinde görevli, küçük, GTP-bağlayan protein.

Ras Büyüme faktörü reseptörlerini, ERK MAP kinaz ve protein-serin / treonin kinaz yolaklarını da kapsayan hücre içi hedeflerle ilişkilendiren, küçük GTP-bağlayan proteinler ailesi.

Rb Retinoblastomların genetik analizi ile tanımlanmış olan bir tümör supressör genden kodlanan ve hücre döngüsünün ilerlemesini denetleyen bir transkripsiyon regülatör proteini.

RecA Rekombinasyon sırasında, homolog DNA molekülleri arasında iplik değişimini sağlayan protein.

rekombinant DNA kütüphanesi Genomik veya cDNA klon koleksiyonu.

rekombinant molekül Vektöre takılan DNA eki.

rekombinasyon Genetik materyal değiş tokuşu.

rekombinasyonel onarım Hasarlı DNA'nın, hasarlanmamış homolog DNA ile rekombinasyon yoluyla onarımı.

replikasyon çatalı Atasal ipliklerin birbirinden ayrıldığı ve yeni iki ipliğin sentezlendiği DNA sentez bölgesi.

replikasyon orijini Replikasyonu başlatan proteinlerin bağlanma bölgesi olarak görev yapan, özel DNA dizisi.

represör (baskılayıcı) Transkripsiyonu engelleyen düzenleyici molekül.

reprodüktif klonlama Klonlanmış organizma elde etme amaçlı nükleer transfer.

reseptör davnregülasyonu Ligand bağlanmasının ardından endositoz ile hücre içerisine alınmasının sonucu olarak hücre yüzeyinde reseptör kaybı.

reseptör olmayan protein-tirozin kinaz Bir, hücre içi protein-tirozin kinaz.

reseptör protein-tirozin kinaz Zarı kat eden ve hücre dışı ligandların reseptörleri olan protein-tirozin kinazlar.

reseptör-aracılıklı endositoz Klatrin-kaplı çukurlarda biriken hücre yüzey reseptörlerine bağlanan makromoleküllerin seçili alımı.

restriksiyon endonükleaz DNA'yı özgül diziden kesen enzim.

restriksiyon haritası DNA molekülü üzerinde restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yerleşimi.

restriksiyon noktası Hayvan hücre döngüsünde geç G1'de bulunan bir kontrol noktası. Bu noktayı geçen hücre, S'ye girmek ve bir hücre bölünmesi geçirmek zorundadır.

retinoid Retinoik asitle ilgili bir molekül.

retinoik asit Vitamin A'dan sentezlenen bir sinyal iletim molekülü.

retrotranspozon Bir RNA ara ürünün ters transkripsiyonu yoluyla hareket eden bir yer değiştirebilen (transposable) eleman.

retrovirus RNA genomundan ters transkripsiyon ile DNA kopyasını oluşturarak çoğalan bir virus.

retrovirus-benzeri eleman Yapısal olarak retrovirusa benzeyen bir retrotranspozon.

revers transkriptaz RNA kalıbı kullanan bir DNA polimeraz.

rezolüsyon Bir mikroskobun, aralarında çok kısa mesafe bulunan objeleri ayırt edebilme gücü.

Rho Hücre iskeleti düzenlenmesinde görev alan küçük, GTP-bağlayan proteinler ailesi.

ribonükleik asit (RNA) Bir ribonükleotid polimeri.

riboz RNA'da bulunan beş karbonlu bir şeker.

ribozim RNA enzim.

ribozomal RNA (rRNA) Ribozomların RNA bileşeni.

ribozomlar RNA ve proteinlerden oluşan ve proteinlerin sentez yeri olan partiküller.

riyanodin reseptörleri Kas ve sinir hücrelerinde bulunan ve zar potansiyeli değişikliklerine yanıt olarak açılan kalsiyum kanalları.

RNA dünyası Kendi kendine replike olabilen RNA molekülleri üzerine kurulu, erken evrim aşaması.

RNA düzeltme Mesajcı RNA'ların protein kodlayan dizilerini değiştiren, kesip-ekleme (splicing) dışındaki RNA işlenmesi olayı.

RNA interferens (RNAi) Mesajcı RNA'ların, kısa komplementer çift-iplikli RNA molekülleri tarafından yıkılması.

RNA kesip-ekleme (splicing) Öncü RNA moleküllerinde eksonların birleştirilmesi.

RNA polimeraz RNA sentezini katalizleyen enzim.

RNaz H RNA-DNA hibrid moleküllerinde RNA ipliğini yıkan enzim.

RNaz P Pre-tRNA'ların 5' ucunu kesen bir ribozim.

rodopsin Retinadaki çubuk hücrelerde bulunan ve ışık absorbsiyonu sonucunda transdusini aktive eden, G-proteini-eşlikli fotoreseptör.

Rous sarkom virusu (RSV) İlk onkogenin saptanmış olduğu, akut transforme eden retrovirus.

S evresi DNA replikasyonunun gerçekleştiği hücre döngüsü evresi.

Saccharomyces cerevisiae Sık çalışılan bir tomurcuklanan maya.

sağaltıcı klonlama Transplantasyon sağaltımı amacıyla kullanılmak üzere embriyonik kök hücre oluşturmaya yönelik, oositlere nükleus aktarımının kullanılabildiği yöntem.

salgı vezikülleri Proteinleri Golgi aygıtından hücre yüzeyine taşıyan, zarla çevrili keseler.

salgı yolağı Salgılanan proteinlerin endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına ve oradan da, salgı vezikülleri aracılığıyla hücre yüzeyine hareketi.

santral (ana) dogma Genetik bilginin, DNA'dan RNA'ya, RNA'dan proteine doğru tek yönde aktığı şeklindeki görüş.

sarkom Bağ dokusu hücrelerinin bir kanseri.

sarkomer Kas hücrelerinde birbiriyle bağlantılı miyozin ve aktin filamanlarının oluşturduğu kasılan birim.

sarkoplazmik retikulum Kas hücresi hücre içi zarlarının oluşturduğu, yüksek konsantrasyonda Ca^{2+} depolayan özel ağ yapısı.

sarmal-dönüş-sarmal Bir transkripsiyon faktörünün, DNA ile temas eden üç ya da dört sarmal bölümden oluşan DNA-bağlanma bölgesi.

sarmal-ilmik-sarmal Bir transkripsiyon faktörünün, iki polipeptid zincirinin dimerleşmesiyle oluşan DNA'ya bağlanma bölgesi. Bu proteinlerin dimerleşme bölgeleri, bir ilmek ile ayrılmış iki sarmal yapı içerir.

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Proteinleri, jel elektroforeziyle, büyüklüklerine göre ayırmak için sıklıkla kullanılan bir yöntem.

selektinler Hücre yüzeyinde sergilenen oligosakkaridleri tanıyan hücre adezyon molekülleri.

selim tümör Köken aldığı bölgede sınırlı kalan tümör.

sellüloz Bitki hücre duvarının temel yapısal bileşenidir, β(1→4) glikozidik bağlarıyla bağlı glukoz monomerlerinden oluşan, doğrusal bir polimerdir.

sellüloz mikrofibrilleri Birkaç düzine paralel selüloz zincirinin bir araya gelmesiyle oluşan ve bitki hücresi duvarlarında bulunan fiberler.

sellüloz sentaz Selüloz sentezini katalizleyen enzim.

sentriol çevre maddesi Sentrozomda bulunan ve mikrotübül kurulumunu başlatan materyal.

sentriol Hayvan hücrelerinin çoğunda sentrozomların içerisinde yer alan, dokuz mikrotübül üçlüsünden oluşmuş, silindir biçimindeki yapı.

sentromer Kardeş kromatidleri birbirine bağlayan ve mitotik iğe tutunmalarını sağlayan, özelleşmiş bir kromozom bölgesi.

sentrozom Hayvan hücrelerindeki mikrotübül-düzenleyen merkez.

sert keratin Saç, tırnak ya da boynuz gibi yapıları oluşturan keratin.

serum yanıt elemanı (SRE) Serum yanıt faktörü tarafından tanınan ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak bir çok acil erken genlerin transkripsiyonunun başlamasına aracılık eden bir düzenleyici dizin.

serum yanıt faktörü (SRF) Serum yanıt elemanına bağlanan bir transkripsiyon faktörü.

sfingomiyelin Serin içeren polar bir baş grubuna bağlı iki hidrokarbon zinciri içeren fosfolipid.

SH2 bölgesi Fosfotirozin içeren peptidlere bağlanan, yaklaşık 100 amino asitlik bir protein bölgesi.

Shine-Delgarno dizisi Bakteri mRNA'larının ribozom üzerine uygun yerleşimini sağlayan, başlama noktasından önceki bir dizi.

sıcaklık-duyarlı mutant Her iki sıcaklıkta da işlevsel olan normal protein yerine, bir sıcaklıkta işlevsel olup diğerinde işlev göremeyen bir protein eksprese eden hücre.

sıkı bağlantı Epitel hücrelerin çevresinde, hücreler arası alanı kapatan ve apikal ve bazolateral bölgeler arasında engel sağlayan, protein ipliklerinin oluşturduğu kesintisiz bir ağ yapısı.

SINE'ler (serpiştirilmiş kısa elemanlar) Memeli genomlarında yüksek oranda tekrarlanan bir retrotranspozon ailesi.

sıvı-fazlı endositoz Endositoz sırasında hücre dışı sıvıların seçilim yapılmaksızın alınması.

siklik AMP (cAMP) Fosfat grubu 3' ve 5' karbon atomlarının her ikisine kovalent bağlanarak, halkasal bir yapı oluşturmuş adenozin monofosfat; hücrelerin çeşitli hormonlara yanıtında önemli bir ikinci mesajcı.

siklik GMP (cGMP) Fosfat grubu 3' ve 5' karbon atomlarının her ikisine kovalent bağlanarak, halkasal bir yapı oluşturmuş guanozin monofosfat; hücrelerin çeşitli hormonlara yanıtında ve görmede önemli bir ikinci mesajcı.

siklinler Cdk'ların aktivitesini düzenleyerek hücre döngüsünde ilerlemeyi kontrol eden bir protein ailesi.

simian virus 40 (SV40) Yaygın çalışılan bir DNA tümör virusu.

simport Bir zardan iki molekülün aynı yönde taşınması.

sinaps Bir nöron ile diğer bir hücre arasında, nörotransmitterlerle bilginin iletildiği kavşak.

sinaps Mayoz sırasında eş kromozomlar arasındaki bağlantı.

sinaptik vezikül Sinaps bölgesinde nörotransmitterleri serbest bırakan salgı vezikülü.

sinaptonemal kompleks Mayoz sırasında eşleşen eş kromozomlar arasında boydan boya oluşan, fermuar benzeri protein yapı.

sinir büyüme faktörü (NGF) Nöronların gelişimini ve sürekliliğini düzenleyen bir polipeptid büyüme faktörü.

sinyal dizisi Polipeptid zincirinin amino ucunda bulunan ve bakteride salgılanmasını, ökaryot hücrede ise endoplazmik retikuluma alınmasını hedefleyen hidrofobik dizi.

sinyal peptidaz Bir polipeptid zincirinin sinyal dizisini proteoliz ile uzaklaştıran enzim.

sinyal tanıma partikülü (SRP) Proteinler ile srpRNA'dan oluşan ve sinyal dizilerine bağlanarak polipeptid zincirlerini endoplazmik retikuluma taşıyan partikül.

sinyal yaması Polipeptid zincirinin üç boyutlu katlanmasıyla oluşan bir tanınma işareti.

sitokalasin Aktin filamanlarının uzamasını durduran bir ilaç.

sitokin reseptörü süper ailesi Hücre içinde protein- tirozin kinaz aktivitesini uyaran bir hücre yüzeyi reseptör ailesi.

sitokinez Mitoz veya mayozu izleyen hücre bölünmesi.

sitokinin Hücre bölünmesini denetleyen bir bitki hormonu.

sitokinler Kan hücrelerini ve lenfositleri denetleyen büyüme faktörleri.

sitokrom *bf* kompleksi Tilakoid zarda bulunan ve fotosentez sürecinde elektronları taşıyan bir protein kompleks.

sitokrom *c* Oksidatif fosforilasyon sürecinde elektronları taşıyan, mitokondri zarındaki bir periferal protein.

sitokrom oksidaz Elektron taşıma sisteminde yer alan ve elektronları sitokrom c'den alıp O2'ne aktaran bir protein kompleks.

sitoplazmik dinein Sitoplazmadaki mikrotübüllerle ilişkili dinein çeşidi.

sitostatik faktör (CSF) Oosit mayozunu metafaz II'de durduran bir sitoplazmik faktör.

sitozin Guanin ile baz eşleşmesi oluşturan bir pirimidin.

sitrik asit döngüsü Asetil CoA'nın CO_2'ye oksitlendiği bir dizi reaksiyon. Oksidadif metabolizmanın ana yolağı.

siyanobakteriler Fotosentez evriminin kökeninde yer aldığı düşünülen, en büyük ve en karmaşık prokaryotlar.

sklerenkim hücreleri Kalın hücre duvarlarıyla özelleşen ve bitkiye yapısal destek sağlayan bitki hücreleri.

SNARE hipotezi Vezikül füzyonunun, vezikül ile hedef zarlar üzerindeki transmembran protein çiftleri (SNARE'ler) aracılığıyla gerçekleştiği hipotezi.

sonlandırma faktörü Dur kodonlarını tanıyarak mRNA translasyonunu sonlandıran protein.

Southern blot Jel elektroforezi ile ayrılmış, özgül DNA fragmanlarını saptamak amacıyla radyoaktif belirleyicilerin kullanıldığı bir yöntem.

spektrin Hücre korteksinde en önemli, aktin-bağlayan protein.

splisozom Pre-mRNA'ların kesilip-eklenerek işlenmesini (splicing) katalizleyen, snRNA'lar ile proteinlerden oluşmuş büyük kompleks.

Src Rous sarkom virusu onkogeni (*src*) tarafından kodlanan bir non-reseptör protein-tirozin kinaz.

SRP reseptörü Endoplazmik retikulum zarında bulunan ve sinyal tanıyan partiküle (SRP) bağlanan bir protein.

srpRNA SRP'nin küçük sitoplazmik bileşeni.

START Maya hücre döngüsünde geç G_1'de yer alan bir düzenleme noktası. Bu noktayı geçen hücre, S evresine girmeye ve bir kez bölünmeye koşullanmıştır.

STAT proteinleri SH2 bölgesine sahip olup tirozin fosforilasyonu ile aktive olarak sitoplazmadan nükleusa geçebilen bir transkripsiyon faktörü.

steroid hormonlar Kolesterol türevi olan bir grup hidrofobik hormon.

sterosil İşitme tüy hücrelerinde bulunan özel bir mikrovilus.

stroma Kloroplastlarda zarf ile tilakoid zarlar arasında yer alan bölme.

stromal işlemci peptidaz (SPP) Kloroplast stromasına alınan proteinlerin geçiş peptidlerini kesen proteaz.

sübstrat Enzim tarafından etkilenen molekül.

şaperon Başka proteinlerin doğru katlanmasına ya da bir araya gelmelerine yardım eden protein.

şaperonin İçerisinde protein katlanmasının gerçekleştiği, bir ısı-şoku proteinleri ailesi.

T hücre reseptörü Hücrelerin yüzeyinde sergilenen antijenleri tanıyan, T lenfositi yüzey proteini.

taksol Mikrotübüllere bağlanan ve stabilize eden bir ilaç.

talin Fokal adezyon bölgelerinde aktin filamanlarının integrinler ile birleşmesine aracılık eden bir protein.

tamamlayıcı DNA (cDNA) Bir mRNA molekülüne tamamlayıcı olan, *in vitro* olarak revers transkriptaz ile sentezlenen bir DNA molekülü.

tarama elektron mikroskopisi bkz. elektron mikroskopi.

taşıyıcı proteinler Küçük moleküllere seçici olarak bağlanıp, zardan geçmelerini sağlayan proteinler.

taşıyıcı RNA (tRNA) Protein sentezi sırasında mRNA ile amino asitler arasında adaptör görevi yapan RNA molekülleri.

TATA kutusu RNA polimeraz II ile transkribe olan ökaryot genlerinin çoğunun genomunda bulunan regülatör DNA dizisi.

TATA-bağlanan protein (TBP) Direkt olarak TATA kutusuna bağlanan bazal transkripsiyon faktörü.

TBP-bağlanan faktörler (TAF'lar) Genel transkripsiyon faktörü TFIID'de TBP ile birleşen polipeptidler.

tek-iplik DNA'ya bağlanan proteinler Tek iplik halindeki bölgelerine bağlanarak, çözünmüş DNA yapısını koruyan proteinler.

telofaz Mitozda, kromozomların dağıldığı ve nükleusun yeniden oluştuğu son evre.

telomeraz Kromozom uçlarındaki tekrar dizilerini kendi RNA kalıbı üzerinden sentezleyen revers transkriptaz.

telomerler Doğrusal kromozomların uçlarını koruyan, basit DNA dizisi tekrarları.

ters genetik Gen işlevinin, klonlanmış gende mutasyon oluşturularak incelenmesi.

ters transkripsiyon Bir RNA kalıbından DNA sentezi.

testosteron Testisten üretilen bir steroid hormon.

Ti plazmidi Bitkilerde gen transferi amacıyla kullanılan bir plazmid.

Tic kompleksi Kloroplast iç zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.

tilakoid zar Kloroplastlarda, elektron taşınmasının ve ATP üretiminin gerçekleştiği en içteki zar.

Tim kompleksi Mitokondri iç zarında bulunan, protein-yer değiştirme kompleksi.

timin DNA'da bulunan ve adenin ile eşleşen bir pirimidin.

tiroid hormonu Tiroid bezinde tirozinden sentezlenen bir hormon.

titin Kas sarkomerinde miyozin filamanlarının merkezde kalmasını sağlayan yay gibi davranan büyük bir protein.

Toc kompleksi Kloroplast dış zarındaki, protein-yer değiştirme kompleksi.

Tom kompleksi Mitokondri dış zarındaki, protein-yer değiştirme kompleksi.

topoizomeraz DNA ipliklerinin geri dönüşümlü kesilip yeniden birleşmesini katalizleyen enzim.

***trans* Golgi ağı** Proteinlerin Golgi'yi terk etmek üzere gruplandırılıp paketlendikleri Golgi bölgesi.

transdüsin Rodopsin tarafından aktive edilince cGMP fosfodiesteraz'ı uyaran G proteini.

***trans*-etkili faktörler** Transkripsiyon düzenleyici proteinler.

transfeksiyon Ökaryot hücreye yabancı bir genin sokulması.

transformasyon Genetik olarak farklı bakteriler arasında DNA transferi.

transforme edici büyüme faktörü β(TGF-β) Genellikle hayvan hücresi çoğalmasını baskılayan bir polipeptid büyüme faktörü.

transgenik fare Germ hattına eklenen yabancı genleri taşıyan fare.

transisyonel ER Proteinlerin Golgi aygıtına geçiş için çıktıkları ER bölgesi.

transit peptidler Proteinleri kloroplastların içine alınmak üzere hedefleyen N-ucu diziler.

transkripsiyon Bir DNA kalıbı üzerinden RNA molekülü sentezlenmesi.

transkripsiyon aktivatörleri Transkripsiyonu uyaran transkripsiyon faktörleri.

transkripsiyon faktörü RNA polimerazın aktivitesini düzenleyen bir protein.

transkripsiyon-eşlikli onarım DNA'nın kopyalanan ipliğindeki hataların öncelikli olarak onarılması.

translokon Polipeptid zincirlerinin, içerisinden geçerek endoplazmik retikuluma aktarıldıkları zar kanalı.

transmembran proteinler Lipid çift tabakayı kat eden ve zarın her iki yanında açık kısımları bulunan, integral zar proteinleri.

transmisyon elektron mikroskopisi bkz. elektron mikroskopi.

transpozon Genom içerisinde farklı konumlara hareket edebilen DNA dizini.

transsitoz Endositozu takiben proteinlerin, gruplanarak plazma zarının farklı bölgelerine taşınması.

triaçilgliserol Bir gliserol molekülüne bağlanmış üç yağ asidi.

tromboksan Kan pıhtılaşmasında rol oynayan bir ökosanoid.

tropomiyozin Aktin filamanlarına bağlanan ve aktin ile miyozin ilişkisini engelleyerek kasılmayı denetleyen ipliksi protein.

troponin Aktin filamanlarına bağlanarak iskelet kasının kasılmasını düzenleyen protein kompleksi.

turgor basıncı Bitki hücrelerinin içerisindeki iç hidrostatik basınç.

tübülin Mikrotübülleri oluşturmak üzere polimerleşen bir hücre iskelet proteini.

tümör Hücrelerin, her türlü, anormal çoğalması.

tümör baskılayıcı gen İnaktivasyonu tümör gelişimine neden olan gen.

tümör başlangıcı (inisiyasyon) Tümör gelişiminin, tek bir hücrenin anormal çoğalmasıyla sonuçlanan ilk aşaması.

tümör ilerlemesi (progresyon) Bir tümör popülasyonunu oluşturan hücrelerde mutasyonların birikmesi ve bunun sonucunda hızlı bölünme artışı ve malignansi.

tümör kamçılayıcı Hücre çoğalmasını uyararak tümör gelişimine yol açan bileşik.

tümör nekroz faktörü (TNF) Programlı hücre ölümünü indükleyen polipeptid büyüme faktörü.

tümör virusu Hayvanlarda veya insanda kansere neden olabilen virus.

ubikinon bkz. Koenzim Q.

ubikütin Hücresel proteinleri hızlı yıkım için belirleyen yüksek oranda korunmuş bir protein.

ultrasantrifüj Örnekleri yüksek hızda döndüren santrifüj.

uniport Tek bir molekülün zardan geçişi.

urasil RNA'da bulunan, adenin ile eşleşen pirimidin.

uydu DNA Bu oyant dansitesi genomik DNA'nınkinden farklı olan, basit dizin tekrar DNA'sı.

uzama faktörü Transkripsiyon ya da translasyonun uzama evresi ile ilişkili bir protein.

uzun uç tekrarı (LTR) Retrovirus DNA'sının uçlarında bulunan ve reverst transkriptaz aktivitesinin ürünü olan, birkaç yüz nükleotidlik direkt tekrarlar.

üçüncül yapı Bir polipeptidin, proteine işlevsel şeklini vermek üzere, üç boyutlu katlanmış hali.

ürün Bir enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen bileşik.

vakuol Ökaryot hücrelerin sitoplazmasındaki, zarla-çevrili büyük kese. Bitki hücrelerinde vakuoller; besin ve artık depolama, makromolekül yıkımı ve turgor basıncını koruma görevlerini yerine getirir.

vektör Klonlanmış bir DNA parçasının konakçı hücrede replikasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan DNA molekülü.

video ile güçlendirilmiş mikroskopi Küçük objeleri görünür kılabilmek için video kameralarının ışık mikroskobuyla birlikte kullanılması.

villin Barsak mikroviluslarında en önemli aktin-demetleyen protein.

vimentin Çeşitli, farklı hücre tiplerinde bulunan bir ara filaman proteini.

vinblastin Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.

vinkristin Mikrotübül polimerleşmesini durduran bir ilaç.

vinkulin Fokal bağlantılarda aktin filamanlarının integrinlerle birleşmesini sağlayan bir protein.

voltaj-kapılı kanallar Elektrik potansiyel değişikliklerine yanıt olarak açılan iyon kanalları.

Western blot bkz. immünblotlama.

X-kromozom inaktivasyonu Dişi hücrelerde, X kromozomlarından birinin üzerindeki genlerin çoğunun inaktivasyonu şeklindeki, dozaj ayarlama mekanizması.

Xenopus laevis Gelişim biyolojisinde bir model sistem olarak kullanılan, Afrika pençeli kurbağası.

X-ışını kristallografisi Bir moleküldeki her bir atomun düzeninin belirlenmesinde, X-ışını yansıma desenlerini kullanan bir yöntem.

yağ asitleri Genellikle bir karboksil (COO-) grubuna bağlı, uzun hidrokarbon zincirleri.

yağlar bkz. triaçilgliseroller.

yama-kıskacı yöntemi Tek bir iyon kanalını izole ederek aktivitesini inceleme yöntemi.

yanlış- eşleşme onarımı Yeni sentezlenen DNA ipliğinden yanlış eşleşmiş bazları uzaklaştıran bir onarım sistemi.

yanlışını düzeltme (proofreading) Yanlış eşleşen bazların, DNA polimerazlar tarafından, seçili olarak uzaklaştırılması.

yapı iskelet (scaffold) proteinleri Sinyal ileti yolağı bileşenlerine bağlanarak, özgül sinyal kasetleri şeklinde düzenleyen proteinler.

yarı korunumlu replikasyon İki atasal ipliğin açılıp yeni yavru ipliklerin sentezi için kalıp oluşturduğu DNA replikasyon süreci.

yer değiştirebilen (transpozable) eleman bkz. transpozon.

yer değiştirme (transpozisyon) DNA dizilerinin genomun tamamında hareketi.

yeşil floresan protein (GFP) Denizanasından elde edilen ve floresan mikroskopta belirleyici olarak kullanılan bir protein.

yıldızsı mikrotübüller Hücrenin dış kenarına doğru uzanan, mitotik iğ mikrotübülleri.

yoğunluğa-bağlı inhibisyon Kültürdeki normal hücrelerin çoğalmalarının, sınırlı bir hücre yoğunluğunda durması.

yoğunluk gradienti santirfügasyonu Sükroz veya sezyum klorid gibi yoğun bir maddenin gradienti içerisinden santirfüjleyerek, partikülleri ayırma yöntemi.

yumuşak keratin Epitel hücrelerinin sitoplazmasında bulunan keratinler.

yüksek-enerji bağları Hidrolize olduklarında yüksek miktarda serbest enerji açığa çıkaran kimyasal bağlar.

yürüme bandı Aktin filamanlarının ve mikrotübüllerin, bir uçlarındaki alt birim kaybının diğer uca alt birim eklenmesiyle dengelenmesi şeklindeki dinamik davranışları.

zara-tutunmuş büyüme faktörleri Plazma zarına bağlı olan ve hücre-hücre dokunuşu sırasında sinyal ileten moleküller olarak işlev gören büyüme faktörleri.

zebra balığı Omurgalı gelişiminin genetik araştırmalarında kullanılan küçük bir balık türü.

zigot Döllenmiş yumurta.

zigoten Eş kromozomların yakın ilişkiye girdikleri mayoz I evresi.

Dizin

A bandları, 448, 449
α-aktinin, 441, 442, 448
ABC taşıyıcılar, 506
Abelson lösemi virusu, 646–647
abl onkogeni, 652, 667
absisik asit, 549, 550
açıklık, nümerik, 21, 22
açık-okuma çerçeveleri, 159
adaptör proteinler, 514
adenilil siklazlar, 551-552, 559, 564, 654
adenin (A), 48, 194
adenomlar, 634
adenoviruslar, 141, 143, 643
adenozin 5'-trifosfat (ATP)
  aktif taşıma ve, 84-85
  aktine bağlı, 438
  enerji deposu, 49
  Gibbs serbest enerji ve, 64-66
  glukozdan üretim, 66-71
  hidrolizi, 503-507
  metabolik enerji ve, 7
  sentezi, 412-413, 424, 426, 506
adezyon kemeri, 444, 452
ADF/ kofilin, 439, 454
adrenalin. bkz. epinefrin
aflatoksin, 634, 635
agrekanlar, 526
Agrobacterium tumefaciens, 127-127
ailesel adenomatöz polipoz, 660
ailesel hiperkolesterolemi (FH), 512-513
akış sitometresi, 594
akışkan mozaik model, 81, 82, 486
aksak iplik, 182-183
aksiyon potansiyeli, 499
aksonem, 475-476
aksonlar, 468, 498
Akt kinaz, 565, 566, 583
aktarımı-durdur dizileri, 363, 365, 367
aktif bölgeler, 57
aktif taşıma, 84-85, 503-507, 507, 508
aktin filamanları
  aterens bağlantı ilişkisi, 445
  ayrışması, 436-440
  organizasyon, 440-441
  tropomiyozin ve, 450
  troponinler ve, 450
  yapı, 435-436
  yapılanması, 436
aktin
  ağları, 440-441
  daralan halkalar, 614
  demetleri, 440-441, 531
  eritrosit zarlarında, 488
  hücre iskeleti düzenlenmesi, 574-575
  kas dışı hücreler, 451-452
  polimerleşme, 436-437
aktine-bağlanan proteinler, 438, 440
aktivasyon enerjisi, 57
akut promiyelositik lösemi, 655, 666
alanin (Ala) (A), 51
Albers, Kathryn, 460-461
aldosteron, 543
alkillenme, 195
alleller, kalıtım, 90
Allen, Robert, 469
allosterik regülasyon, 62-63, 310
alternatif kesip-ekleme, 144, 145, 172, 272-273
Altman, Sid, 6, 288
amfipatik moleküller, 6, 45
amiloplast, 421
amino asitler
  asit yan zincirler, 51
  bazik yan zincirler, 50
  biyosentez, 77
  esansiyel, 77
  hidrofilik yan zincirler, 50
  hidrofobik yan zincirler, 50
  insülin dizini, 53
  peptid bağları, 51-52
  polar yan zincirler, 50
  protein bileşimi, 50
  tRNA'lara bağlanma, 283
aminoaçil tRNA sentaz, 282
γ-aminobütirik asit (GABA), 546
amiyotrofik lateral skleroz (ALS), 461
Amoeba proteus, 12-13
amonyak (NH_3), 76-77
ampisilin direnci, 110
ampisilin direnç geni (*amp*^{r}), 124
ana dogma, 98, 101
anabolik yolaklar, 74
anafaz
  anafaz A, 474
  anafaz B, 474
  başlangıcı, 617
  hayvan hücreleri, 608
  mikroskop görüntüsü, 610
  MPF inaktivasyonu, 613-614
  sırasında nükleus, 346
anafaza-ilerleten kompleks, 613
anahtar-kilit modeli, 58
Anfinsen, Christian, 52-53, 299
anjiyogenez, 638, 666
ankirin, 443, 488
anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı, 274-275
Antennapedia mutatı, 253-254
antibiyotikler, 292, 519
antijenler, 119, 214
antikodon halkası, 282
antikor problar, 119-121
antikorlar, monoklonal, 120
antiport, 508
antisens nükleik asitler, 130
AP endonükleazlar, 197
AP-1 transkripsiyon faktörü, 654
Apaf-1, 581
APC geni, 660, 663
apikal bölge, 381, 491, 515

apolipoprotein B, 274
apoptoz, 580-582, 639, 662. bkz. programlı hücre ölümü
apoptozom, 582
ara filamanlar, 455-462
  epitel hücreler, 460-461
  kaderin bağlantısı, 530
  organizasyon, 457-459
  yapılanma, 456-457
Arabidopsis thaliana
  deneysel model olarak, 18
  genomu, 159, 166-167
  etilen yanıtı, 550
  haploid DNA, 12
  mitokondri genomu, 402
  sentromerler, 157
  translasyon, 298
Aracı proteinler, 242, 256
aralayıcı diziler, 141
aralık bağlantılar, 496, 532
araşidonik asit, 548-549
ARF1, 385, 386-387
arjinin (Arg) (R), 51
arkebakteriler, 8-9
Arp2 / 3 kompleksi, 438, 454
ARS (bağımsız replike olan diziler), 190
α-sarmallar, 54, 55, 363, 365, 488
asetilkolin reseptörü, nikotinik, 500
asetilkolin, 500, 546
asetillenme, 257–258
asit hidrolazlar, 389
asparajin (Asn) (N), 51
aspartik asit (Asp) (D), 51
aspirin, 548-549
aterens bağlantılar, 444, 531, 575
ATM kinaz, 597
ATP sentaz, 413, 414
ATP, bkz. adenozin 5'-trifosfat
ATR kinaz, 597
aurora B, 613
Avery, Oswald, 93
avian lökozis virusu (ALV), 645
ayakizi çıkarma, DNA, 233
aydınlık-alan mikroskopisi, 22
azot bağlama, 76-77

B- lenfositler
  antikor üretimi, 119, 214
  immünglobulin genleri, 247-248
  kök hücreler ve, 624
  viral transformasyon, 643
β tabakalar, 54, 55, 82
Bad proteini, 583, 584
bağ dokusu, 15
bağımsız replike olan diziler (ARS), 190
bağlantı kompleksleri, 531
bağlantı, genetik, 92
bakteri yapay kromozomu (BAC), 111, 165
bakteriler
  dış zarlar, 489
  hücre duvarları, 518-519
  kapsül, 93
  klonlanmış gen ekspresyonu, 114
bakteriyofajlar
  P1, 111
  T4, 36, 98, 99
  λ, 104-105, 109, 122, 211-214
bakulovirus vektörleri, 114
Baltimore, David, 101-103
*Bam*H1 endonükleaz, 218
band 3, 488
band 4.1, 488
bantta yürüme, 437-438
basit-dizi tekrarları, 146
başlama faktörleri, 290-296
baz -çıkarma onarımı, 197-201
baz eşleşmesi, 284
bazal cisimler, 465-477
bazal lamina, 522-523, 525, 526
bazolateral bölge, 381, 491, 515
Bcl-2 ailesi proteinler, 581, 582, 656
bcr geni, 652
bcr/abl onkogeni, 667
Beadle, George, 92-93
Becker kas distrofisi, 443
benzo(a)piren, 634
Berget, Susan M., 142-143
besinlerdeki amino asitler, 77
beyaz kan hücreleri. bkz. lökositler; makrofajlar; nötrofiller
β-fıçılar, 82, 83, 489
B-hücre lenfoması, 643
Bid, 582
BiP, 362
bir gen-bir enzim hipotezi, 93
birincil hücre duvarı, 521
birincil yapılar, 54
Bishop, J. Michael, 647, 648-649
bitkiler
  genişleme, 522
  genomları, 166-167
  glukoneogenez, 75
  Golgi aygıtı, 382
  hormonlar, 549-550
  hücre adezyonu, 533
  hücre duvarları, 14, 519-522
  hücre kültürü, 34
  mikroskop fotoğrafları, 13
  sitokinez, 614
  uzama, 522
  vakuoller, 382
  yapısı, 11
biyoinformatik, 158-159
blast hücreleri, 667
Blobel, Günter, 330, 358, 360-361
Boss mutantları, 576
Boveri, Theodore, 464
boyama, 26-27
bölgeye özgül rekombinasyon, 211-216, 213-214
bölünen maya. bkz. *Schizosaccharomyces pombe*
Brady, Scott, 469
brassinosteroidler, 543
BRCA genleri, 203, 660
Brenner, Sidney, 98
bride-of-sevenless mutantları, 576
Britten, Roy, 145
Broker, Tom, 142
Brown, Michael, 512-513
Burkitt lemfoma, 643, 651
Butel, Janet, 330
büyüme faktörleri, 547-548, 594, 605-607
büyüme hormonu, 359
büyüme, 594-596

Caenorhabditis elegans
  deneysel model olarak, 17-18
  genomu, 149, 163-165
  hücre ölümü, 580
  iyon kanal genleri, 502
  kinezin, 472
  Ras/Raf/ERK yolağı, 576-577
  vulva, 577
  yapısı, 17
Cairns, John, 182
Cajal cisimleri, 339
CAK (Cdk-aktive eden kinaz), 605
Calvin döngüsü, 73-74, 418, 428
CaM kinaz, 564
cAMP fosfodiesteraz, 559
cAMP yanıt elemanı (CRE), 560
cAMP-bağımlı protein kinaz, 313, 559
CD45, 558
Cdc2, 314-315, 347, 349, 600-606, 602
Cdc25, 603, 605, 608
Cdc28, 600-602
Cdc42, 575
Cdk'lar (siklin-bağımlı kinazlar), 604, 605
cDNA kütüphaneleri, 123
cDNA, üretim, 108
Cech, Tom, 6, 288
ced geni, 580
Celera, Genomiks, 169, 170
cGMP fosfodiesteraz, 561-562
Charcot-Marie-Tooth hastalığı tip 2B1, 340
Chargaff, Erwin, 95
chk1 kinaz, 597, 608
chk2 kinaz, 597, 608
Chow, Louise, 142
cis Golgi ağı, 375
cis-etkili kontrol elemanı, 238

cis-etkili regülatör diziler, 245-249
Claude, Albert, 25, 28
Cln'ler (G_1 siklinler), 604
c-myc onkogeni, 651, 652
Coastal protein, 578
Cockayne sendromu, 199, 200
Cohen, Stanley, 547, 553
Collins, Frances, 170
COPI-kaplı veziküller, 612
COP-kaplı veziküller, 386-387
Corey, Robert, 54
Coulombe, Pierre A., 460-461
CpG dinükleotidler, 260
CRE (cAMP yanıt elemanı), 560
CREB (CRE-bağlanan protein), 560, 564
CRE-bağlanan proteinler (CREB), 560, 564
Crick, Francis, 94, 180
CSA proteinler, 200
CSB proteinler, 200
CSF (sitostatik faktör), 619-620
CSL, 579
Cubitus interruptus (Ci), 578

çapraz bağlantı, 440, 448
çekinik genler, 90
çekirdek (nükleus), 323-353
  iç düzeni, 335-339
  interfaz, 336
  interfazda yeni oluşum, 349-350
  işlevsel bölgeleri, 337-339
  memeli, 337
  mitoz ve, 345-350
  sitoplazma ile alış-veriş, 323-335
  tanımı, 9
  transplantasyon, 600-601
  yerleşim, 10-11
çekirdekçik (nükleolus)
  rRNA genleri ve, 339-342
  rRNA genleri, 341
  yapısı, 342
  yerleşim, 10-11, 324
çinko parmak bölgeler, 252, 253
çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), 185-186, 608
çoklu ilaç direnç (mdr) geni, 506
çözünürlük, tanımı, 21-22

D1 onkogen, 655
dağılım, genetik, 92
damar elemanları, 13
Darwin, Charles, 549
de Duve, Christian, 28, 392, 510
deaminasyon, 194
Degenstein, Linda, 460-461
Deisenhofer, Johann, 423
DeLisi, Charles, 170
demir yanıt elemanı (IRE), 276, 296-297
dendritler, 467
denge santirfügasyonu, 29
deniz kestanesi embriyoları, 602
deniz kestanesi spermi, 476
deoksiribonükleik asit. bkz. DNA,
2'-deoksiriboz, 48
deri, 20, 460-461, 636
desmin, 456
desmogleinler, 531
desmokolinler, 531
desmoplakin, 458, 530
desmozomlar, 458, 530
deterjanlar, 487
diaçilgliserol, 562-563, 563, 565
Dictyostelium discoideum, 12, 17, 455
dideoksinükleotidler, 112
diferansiyel interferans-kontrast mikroskopisi, 23
diferansiyel santirfügasyon, 28-29
difüzyon
  aralık bağlantılar ve, 532
  kolaylaştırılmış, 495-496, 496
  pasif, 494
dihidrofolat redüktaz, 226
dihidroksiaseton, 43
dimetilnitrozamin, 634, 635
dinamik kararsızlık, 462-463
dinamin, 514
dineinler, 468, 470-471
diploid hücre, 90
diploten evresi, 615, 617
Dischevelled proteini, 578
distrofinlar, 443
disülfid bağları, 52-53
diyakinez evresi, 615, 617
dizi analizi, DNA, 111-113
DNA glikozilazlar, 197
DNA hasarı
  apoptoz ve, 662
  direkt geri dönüştürme, 194-197
  hücre döngüsü inhibisyonu, 608
  kanser ve, 639
  programlanmış hücre ölümü, 579-584
  pürinsizleşme, 194
DNA ligazlar, 107, 182
DNA mikrodizinleri, 117-119
DNA polimerazlar,
  aksesuar proteinler ve, 185-186
  E.coli, 96
  gözden geçirme, 180-182
  hata-eğilimli, 201
  hücre döngüsü inhibisyonu, 607
  Thermus aquaticus, 115
  yanlışını-düzeltme, 188
DNA provirus hipotezi, 102-103
DNA transpozon, 147
DNA. bkz. cDNA; rekombinant DNA
  ayakizi çıkarma, 233
  bağlanan moleküller, 108
  dizi analizi, 111-113, 170-171
  hücre içeriği, 12, 594
  ilmiklenme, 248
  kalıtım ve, 93
  klonlama vektörleri, 111
  kloroplast, 418
  kodlamayan, 139-140
  metillenme, 260-261
  mitokondri, 12, 401-403
  nükleer organizasyon, 335-339
  onarım, 192-203
  paketlenme, 152-153
  PCR amplifikasyonu, 115-117
  rekombinant, 104-117
  rekombinasyon, 204-211
  replikasyon bölgeleri, 338
  replikasyon orijini, 189
  replikasyon, 95-96, 179-193, 598
  replikasyonun güvenilirliği, 188-189
  retroviral, 220
  RNA sentezi ve, 98
  sentez, 112
  TBP-TFIIB kompleksi ve, 242
  tekrarlayan diziler, 145-147
  telomerik, 158
  uydu, 146
  viral, 93, 141
  yapısı, 94-95
  yarıkorunumlu replikasyon, 96
  yeniden düzenlenmeler, 211-226
DNA-afinite kromotografisi, 250, 251
DNA-bağlanma bölgeleri, 253
DNaz, 233
Dobberstein, Bernhard, 360-361
doku kültürü, 32
dolikol fosfat, 306
dolikol, 367
domeyn, protein, 55
dominant genler, 90
dominant inhibitör mutantlar, 132
dondurup-çatlatma, 27-28, 487
dopamin, 546
döllenme
  DNA metllenmesi ve, 261
  mayoz ve, 91, 615-621
  tanımı, 620-621
dönen-çapraz köprü modeli, 450
döngüsel elektron akışı, 425-426
dördüncül yapılar, 56
Drosophila melanogaster,
  Antennapedia mutantları, 253, 254
  bileşik göz, 576
  deneysel model olarak, 18
  genetik çalışmalarda, 91
  genom, 149, 163-165
  haploid DNA, 12
  homeotik mutantlar, 253
  kromozomlar, 336-337
  Krüppel mutasyonu, 255

politen kromozomlar, 164
programlı gen amplifikasyonu, 226
Ras/ Raf/ ERK yolağı, 575-576
replikasyon orijinleri, 191
sentromerler, 157
transformer geni, 273
Druker, Brian, 668
Duchenne kas distrofisi, 443
Dunnigan-tipi kısmi lipodistrofi, 340
düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler), 511, 512-514, 516-517
düz endoplazmik retikulum, 356, 362
düz kas, 447
Dynan, William, 251

E2F ailesi, 606
Eagle, Harry, 32-33
Ecker, Robert, 599, 601
Eckhardt, Walter, 554
EcoR1, 104, 106
Edidin, Michael, 490
EF-Tu / GTP, 295
ekdizon, 543
ekleme (insersiyon) dizileri (IS), 217
eksinükleazlar, 198, 200
ekson karılması, 144
eksonükleazlar, 184
eksportinler, 329
ekspresyon vektörleri, 114
elastik lifler, 525
elastin, 525
elayoplastlar, 421
elektroforetik-devingenlik-değişim analizi, 249
elektrokimyasal gradient, 412-413
elektron akışı, 422-425, 425-426
elektron mikroskopisi, 25-28, 327, 487
elektron taşıma zinciri, 69-71, 408-410, 412-413, 424
elektroporasyon, 126
Elk-1, 569, 654
embriyo hücreleri, 593
embriyonik kök hücreler (ES), 31, 127
Emery-Dreifuss kas distrofisi, 340-341
endokrin sinyal iletimi, 542
endonükleazlar, 219, 615
endoplazmik retikulum (ER)
-den dışarı çıkış, 372-374
fosfolipid yer değiştirmesi, 372
işlev, 356-374
lipid sentezi, 369-372
mikrotübüller ve, 473
protein katılması, 362
protein katlanması, 366-369
proteinlerin hedeflenmesi, 357-362
tanımı, 9
veziküller taşınma, 374
yerleşim, 10-11, 324
endorfinler, 547
endosimbiyoz, 10, 12, 401
endositoz, 390-391, 393
fagositoz, 510-511
klatrin-bağımlı, 514
protein trafiği, 515-518
reseptör-aracılıklı, 511-515
sıvı faz, 515
endotel hücreler, 506, 529
endozomlar, 515, 516
Enerji Departmanı, 170
enerji, reaksiyon, 57-58
enerji
depolanması, 43-44, 49
fotosentez ve, 72, 73, 422-426
metabolik, 7-8
mitokondriler ve, 399-408
tutulması, 423
enkefalinler, 547
entaktinler, 527
enzimler. bkz. spesifik enzimler,
asit hidrolazlar, 389
fosforillenme, 63
genler ve, 91-93
geriye tepki inhibisyonu ve, 62
histidin ve, 50-51
homolog rekombinasyon, 209-211
katalitik aktivite, 56-59
protein katlanması ve, 303
epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü, 553
epidermal büyüme faktörü (EGF), 547, 548
epidermolizis bullosa simpleks (EBS), 461
epinefrin, 312, 546, 559
epitel hücreler
ara filamanlar, 460-461
barsak, 507
glukoz taşınması, 508
işlevi, 15
kistik fibroz ve, 509
klor iyon kanalları, 506-507
mikrograf, 13-14
plazma zarları, 381, 491
sıkı bağlantılar ve, 531
kirpikler, 476
Epstein-Barr virusu, 35, 640, 643
ErbA, 655
ErbB-2 onkogeni, 652-653, 668
ERCC1, 199
Erikson, Ray, 554
eritrolösemi, tavuk, 655
eritromisin, 292
eritrositler
işlevi, 15
integral zar proteinleri, 487-488
mikro-fotoğraf, 14
morfoloji, 442
periferal zar proteinleri, 487-488
plazma zarı, 484
kök hücreler ve, 622-624
ERK (hücre dışı sinyal-denetimli) kinazlar, 565, 566-570, 620, 653
erken-bölge genleri, 642
ERM proteinleri, 443
Escherichia coli
deneysel model olarak, 15-16
DNA replikasyonu, 180-182
genom, 161
genom büyüklüğü, 149
genom replikasyonu, 189
haploid DNA, 12
koloniler, 16
lac operonu, 289
mutantların izolasyonu, 180
nükleotid-çıkarma onarımı, 198
ortam, 16, 96
peptidoglikan, 519
plazma zarları, 80
promotör diziler, 232
replikasyon çatalı modeli, 187
RNA polimeraz, 232
tRNA' lar, 283
yanlış eşleşme onarımı, 201
yapı, 8-9
eşeyli çoğalma, 616
etanolamin, 46
etilen, 549, 550
ETS'ler, 343
etyoplastlar, 421, 422
Euglena, 12
Evans, Martin, 623
evrim
ekson karılması, 144
hücreler, 4-15, 11
intronlar ve, 144-145
metabolizmanın, 7-8
zaman skalası, 5

$FADH_2$, 401, 410
fagolizozomlar, 394, 510
fagositoz, 393-394
fagozomlar, 393-394, 510
FAK (fokal adezyon) kinaz, 573-574
falloidin, 438
fare, 12, 20
farklılaşma, sinyal iletimi, 575-579
Fas ligand, 582
Fas, 582
faz-kontrast mikroskopisi, 23
fenilalanin (Phe) (F), 51, 79
fenilketonüri, 79, 92
fenotip, 90
feofitinler, 423
ferritin, 296-298
ferrodoksin (Fd), 424
fırça kenarlar, 445
fibrillarin, 339
fibroblastlar, 14, 15, 523

fibronektinler, 526
filamansı (F) aktin, 436-437
filamin, 441
filopodlar, 446, 454, 575
fimbrin, 440, 445
Fischer, Ed, 312
flavin adenin dinükleotid ($FADH_2$), 69-72
flipazlar, 372
floresans ile-aktiflenen hücre ayırıcı, 594
floresans *in situ* hibridizasyon (FISH), 119, 169
floresans mikroskopisi, 23-24
fodrin, 442
fokal adezyon, 444, 455, 527
Folkman, Judah, 666-668
follikül uyarıcı hormon, 547
forbol esterleri, 563, 635
fosfatidik asit, 46
fosfatidiletanolamin, 46, 484
fosfatidilinositid (PI) 3-kinaz, 565, 583-584, 656
fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP_2), 562-563
fosfatidilinositol, 46, 484
fosfatidilkolin, 46, 484
fosfatidilserin, 46, 484
fosfodiester bağları, 49
fosfodiesterazlar, 564
fosfolipaz C, 562-563
fosfolipid çift tabakalar. bkz. zarlar
  geçirgenlik, 83, 494
  kaynaşma, 387
  kolesterol katılımı, 81
  plazma zarı, 483-486
  yapısı, 80
fosfolipid transfer proteinleri, 408
fosfolipidler
  bileşim, 45
  hücre evrimi ve, 6-7
  kalsiyum iyonları ve, 562-565
  sentezi, 371
  yer değişimi, 372
fosforilaz kinaz, 559-560
fosforillenme
  ara filaman proteinleri, 457
  cAMP yolakları, 559
  çevrimin düzenlenmesi, 299
  histon, 258-259
  miyozin düzenlenmesi,
  miyozin hafif zinciri, 449
  oksidatif, 69, 400, 408-414
  otofosforilasyon, 555
  protein, 63, 311-313
  reseptör protein-tirozin kinazlar, 555
fotoaktivasyon, 196
fotomerkezler, 422-423
fotoreseptörler, 561-562, 576
fotosentetik reaksiyon merkezleri, 423-424, 489
fotosentez, 7, 8, 72-73, 422-426
fotosistem I, 418, 424
fotosistem II, 418, 424
fotosolunum, 428-429
Franklin, Rosalind, 94
Frizzled proteini, 578, 579
Frye, Larry, 490
Fuchs, Elaine, 459, 460-461
Fused protein, 578

G proteini ile eşleşmiş reseptörler, 551-552, 561-562, 654
G proteinleri, 546, 550-552
G_0 evresi, 595 ayrıca bkz. hücre döngüsü
G_1 evresi, 592, 594 ayrıca bkz. hücre döngüsü
G_1 siklinler (Cln'ler), 604
G_2 evresi, 592, 594 ayrıca bkz. hücre döngüsü
G_2 kontrol noktası, 608
GABA (γ-aminobütirik asit), 546
β-galaktozidaz, 237
Gallo, Robert, 105
GAP (GTPaz'ı aktive eden protein), 651
Gaucher hastalığı, 389, 392
GC kutuları, 249
Gcn5p, 258
GDP-ayrışma inhibitörleri (GDI'lar), 388
geçiş durumu, 57
Gelinas, Richard, 142
gen aileleri, 148
gen aktarımı, 125-128, 649, 659
gen amplifikasyonu, 225-226, 652
gen ekspresyon profilleri, 665
gen tedavisi, 509
genel transkripsiyon faktörleri, 240-243
genetik şifre,
  bilgi aktarımı, 99-101
  fazlalığı, 283
  mitokondri, 403
genler
  bağlantı, 92
  dağılımı, 92
  duplikasyonlar, 148-149
  ekspresyon, 96-103, 113-115
  enzimler ve, 91-93
  inaktivasyon, 129
  kalıtım ve, 90-91
  mutasyon oluşturma, 128-133
  ökaryot, 141
  ökaryotlardaki işlevi, 123-133
  proteinle bağlantısı, 97-98
  tanım, 141
genom kütüphaneleri, 121-122
genomik damgalanma, 261
genomlar
  adenovirus, 643
  bitkiler, 166-167
  diziler, 158-173
  DNA dizi analizi, 111-113
  E. coli, 140, 145
  hücresel, 139-177
  insan, 121, 141, 146, 167-173, 170-171
  kloroplast, 417-418
  mayalar, 161-162
  mitokondri, 401-403
  ökaryot, 139-150
  prokaryot hücre, 159-161
  retroviruslar, 644
  RSV, 645
  viral, 36, 106-107
  yüksek ökaryot, 149
genotipler, 90
geri tepki inhibisyonu, 62, 310
germ hücreleri, 616
Gibbons, Ian, 469
Gibbs serbest enerjisi, 64-66
Gibbs, Josiah Willard, 64
giberellinler, 549-550
Gilbert, Walter, 238
Gleevec (STI 517), 667, 668
Gli proteinleri, 661
glikoforin, 443, 488
glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), 578
glikojen sentaz, 559, 560
glikojen, 43, 312, 559-560
glikokaliks, 493
glikolipidler, 47, 379, 485
glikoliz, 7-8, 66-71
glikoproteinler, 305-306, 370, 487
glikozaminoglikanlar (GAG'lar), 525
glikozidik bağ, 42, 43
glikozilfosfatidilinozitol (GPI) çapalar, 309, 368, 369, 489-490
glikozillenme, 305, 367, 377-379
glioksilat döngüsü, 427-428
gliseraldehid, 43
gliserol fosfolipidler, 45
glisin (Gly) (G), 50, 51, 546
globinler, 148
β-globin geni, 144
globüler (G) aktin, 436-437
glukagon, 547
glukoneogenez, 74-75
glukoserebrosidaz, 392
glukoz taşıyıcı, 495
glukoz
  aktif taşınma, 507-508
  ATP üretimi, 66-71
  baskılama, 238-239
  kolaylaştırılmış difüzyon, 496
  yapı, 43

glutamat, 546
glutamik asit (Glu) (E), 51
glutamin (Gln) (Q), 51
GM130, 613
Goldstein, Joseph, 512-513
Golgi ağı, *cis*, 375
Golgi aygıtı
  glikozillenme, 377, 378
  hemiselüloz sentezi, 520
  işlev, 374-382
  mikro-fotoğraf, 376
  organizasyonu, 375-377
  pektin sentezi, 520-521
  protein çıkışı ve, 372, 380-382
  protein glikozillenmesi, 377-379
  protein sınıflanması, 380-382
  sitoplazmik dinein ve, 473
  tanım, 9
  vezikül yanaşması, 612
  veziküller taşınma, 374
  yerleşim, 10-11
Golgi katmanları, 375, 383
Golgi kompleksi. bkz. Golgi aygıtı,
Golgi matrisi, 612
Gram boyama, 518
Gram, Christian, 518
granülositler, 15, 623
Grb2, 568, 569
GroEl, 302
GSK-3 kinaz, 583
gsp onkogeni, 654
GTP, işlevi, 463-464
GTPaz-aktive eden protein (GAP), 567, 651
GTP-bağlayan küçük proteinler, 567-568
GTP-bağlayan proteinler, 385, 388, 454, 492
guanilil siklazlar, 545, 558, 561-562
guanin (G), 48, 194
guanin nükleotid değiştirme faktörü, 567
güçlendiriciler, 246, 247, 248

H^+. bkz. protonlar
H19 geni, 261
Haemophilus influenzae, 159-160
Hanson, Jean, 449
haploid hücreler, 90-91
Harris, Henry, 657
Hartwell, Lee, 599
Harvey sarkom virusu, 649
hata-eğilimli onarım, 201-202
Hawking, Stephen, 461
hayvan hücreleri, 11, 14, 125-127, 615. bkz. insanlar; memeliler; omurgalılar
hedgehog genleri, 578
Hedgehog yolağı, 654, 660-661
heksoz şekerler, 43
HeLa hücreleri, 32
helikazlar, 186, 189
hemidesmozomlar, 458, 527, 528
hemiselülozlar, 380, 520, 521
hemoglobinler, 56, 59
heparan sülfat, 525
hepatit B virusu, 35, 640-641
hepatit C virusu, 640-641
Herceptin, 668
herpesviruslar, 643
heterofilik etkileşimler, 529
heterokromatin, 153, 335-337
heterotrimerik G proteinleri, 551
hHR23B, 199
hız santirfügasyonu, 29, 31
hidrofilik moleküller, 6, 494-495
hidrofobik moleküller, 6, 494-495
hidroksilizin, 524
hidroksiprolin, 523
hipofiz bezi, 547
histaminler, 546
histidin (His) (H), 50-51, 51
histon asetillenmesi, 257-258
histon asetiltransferaz (HAT), 257-258
histon deasetilaz (HDAC), 257
histon kodu, 258
histonlar
  kromatindeki, 150
  kromozom yoğunlaşması ve, 348-349, 612
  majör proteinler, 151
  metillenme, 260
  modifikasyon, 257-259
hiyaluronin, 526
HMGN proteinler, 256-257
Hoagland, Mahlon, 282
Hodgkin, Alan, 497
Hoffarth, Vernita, 288-289
Holliday kavşağı, 207-209
Holliday modeli, 207-209
Holmes, Kenneth, 436
homeodomeynler, 253
homeokutular, 253
homofilik etkileşimler, 529, 530
homojenizasyon, 28
homolog rekombinasyon, 129-130, 204-211
hormonlar
  bitki, 549-550
  hipofiz-salgısı, 547
  sinyal iletiminde, 542
  steroid, 543-545
Hozumi, Nobumichi, 218-219
Hsp100 proteinleri, 419
Hsp60 ailesi, 301-303, 418-419
Hsp70 ailesi, 301-303, 362, 404, 418-420, 430
Hsp90 ailesi, 301-303, 544
Huber, Robert, 423
Hunt, Tim, 602
Hunter, Tony, 553, 554-555
Huxley, Andrew, 449, 497
Huxley, Hugh, 449
hücre adezyon molekülleri, 528-531
hücre biyolojisi araçları, 20-37
hücre dışı matris, 518-528, 522-528
hücre döngüsü 591-630
  DNA replikasyonu, 598
  durdurulması, 597-599
  düzenlenme, 594-596
  embriyonik hücreler, 593
  evreler, 592-594
  ilerleme, 599-608
  ilerlemenin duraksatılması, 606-609
  interfaz nükleusu, 336
  kontrol noktaları, 596-598
  metafaz, 610-612
  mitoz sırasında nükleus, 345-350
  mitoz, 153, 154, 608-611
  ökaryot hücreler, 591-599
  sitokinez, 614-615
hücre duvarları
  bakteri, 518-519
  birincil, 521
  bitki hücreleri, 13
  bitki, 519-522
  E.coli, 8
  hücre dışı matris ve, 518-528
  ikincil, 521
  mantar, 520
hücre içi sinyal iletimi, 558-571
hücre iskeleti,
  düzenlenme, 574-575
  hücre dışı matris ve, 528
  hücre hareketi ve, 435-482
  protein filamanlar, 435
  sinyal iletimi ve, 571-575
  tanımı, 9-10
hücre korteksi 442
hücre kültürü
  hayvan hücreleri, 29-33
  hücre transformasyonu, 640
  kök hücreler, 622-623
  memeli hücreleri, 32
  ortam, 16
hücre ölümü 558, *ayrıca bkz.* apoptoz; programlanmış hücre ölümü
hücre plakası, 614-615
hücre yüzey reseptörleri, 550-558
hücre zarları. bkz. zarlar,
hücre-hücre etkileşimleri, 44, 493, 528-533
  haberleşme, 541-589
  kontakt inhibisyon, 637-638
  sinyal iletim yolları, 542-543
hücreler arası adezyon molekülleri (ICAM'lar), 529

hücreler
bölünmesi, 90-91, 467
deneysel model olarak, 15-20
DNA içeriği, 12
evrim, 4-15, 11
farklılaşmış, 621-622
göçü, 454-455
hareketi, 435-482
hatları, 33
hücre dışı matris ve, 528
mikroskopisi, 23
moleküler bileşim, 41-56
polaritesi, 460-468, 491, 515
sinyal iletimi, 541-589
transformasyonu, 640
yüzey uzantıları, 445-446
hücreyi alt bileşenlerine ayırma, 28-29, 30

IAP'lar (apoptoz protein inhibitörleri), 581
Ink4 ailesi, 606
INK4 geni, 660, 661-662
Inoué, Shinya, 469
ısı-şok proteinleri, 300-303
ışık mikroskopisi, 21-25
ışık reaksiyonları, 72
ışık, 72-73, 422-426

i geni, 237
iğ kontrol noktaları, 598
iğ kutupları, 474-475
iki-foton eksitasyon mikroskopisi, 26
ikincil hücre duvarları, 521
ikincil mesajcılar, 559
ikincil yapılar, 54-55
ilaç direnci, 506
ilaç metabolizması, 372
immün sistemler, 214
immünblotlama, 120
immünçöktürme, 120-121, 268
immünglobulin genleri, 247-248, 360
immünglobulinler
gen düzenlenmesi, 215, 218-219
güçlendiricileri, 248
Ig süperailesi, 528
Igk, 333
yapı, 214
importinler, 329-331
in situ hibridizasyon, 119, 165
in vitro kesip-ekleme, 266
in vitro mutagenez, 128
in vitro translasyon, 100
indüklenmiş uyum, 58
influenza virusu, 101
inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3), 562-563, 564
inozitol, 46
insan immün yetmezlik virusu (HIV), 105, 644
insan papilloma virusları, 34, 35
insan T-hücre lenfotropik virusu (HTLV-1), 35, 640, 644
insanlar
genom büyüklüğü, 149
genomu, 167-173, 170-171
haploid DNA, 12
kromozom 1, 169-172
mitokondri genomu, 402
tekrarlayan genom dizileri, 146
insülin, 53, 304, 547
insülin-benzeri büyüme faktörü II, 661
integral zar proteinleri, 81, 486-487
integraz (Int), 213
integrinler
fibroblast tutunması ve, 444
hücre-hücre etkileşimleri ve, 528
sinyal iletimi ve, 571-574, 573
yapısı, 527
interfaz, 467, 592, 610
α-interneksin, 456
intronlar
insan genomu, 149
kend-kesip-ekleme, 271, 288, 289
keşfi, 142-143
iskelet kası, 447
işlenmiş psödogenler, 149, 223-224
iyon gradientleri, 507-508
iyon kanalları, 496-503, 501, 503
iyon pompaları, 497-508, 498, 503, 505-508
izolösin (Ile) (I), 51, 62

Jacob, François, 98, 236
JAK / STAT yolağı, 570-571
janus kinaz (JAK), 557
jel elektroforezi, 104-106
Jun protoonkogeni, 654

kaba endoplazmik retikulum, 358, 362
Kabsch, Wolfgang, 436
kaderinler, 444, 528, 530
Kadonaga, James T., 251
Kalderon, Daniel, 330
kalın filamanlar, 450
kalıtım, 90-91, 93
kalıtımsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), 201, 203
kallus, kültür, 34
kalmodulin, 446, 452, 564
kalneksin, 369
kalp kası, 447
kalponinler, 455
kalretikulin, 369
kalsiyum iyonu
depolama, 565
fosfolipidler ve, 562-565
hücre adezyonu ve, 528
hücre içi, 565
pompalar, 505-508
kalsiyum kanalları, 564
kamçı, 465, 474-478
kan damarları, 545, 638
kan hücreleri, 623-624
kanal proteinleri, 83, 84, 495
kanser. bkz. tümörler
tanısı, 664, 665
erken tanı, 664-665
gelişimi, 633-636
HIV ve, 105
hücre özellikleri, 636-640
insan onkogenleri, 649-652
kemoterapi, 463
korunma, 664-665
MDR taşıyıcılar, 506
moleküler biyoloji ve, 664-669
nedenleri, 634-635
otokrin sinyal iletimi, 543
ölüm oranı, 633
ras genleri ve, 649
sinyal iletimi, 572-573
tedavi, 666-668
teratokarsinomlar, 623-624
tipleri, 632-633
tümör baskılayıcı genler, 657-660
viruslar ve, 35
Kaposi sarkomu, 105
Kaposi sarkomu-ilişkili herpes virusu, 640, 643
karaciğer kanseri, 635, 641
karanlık reaksiyonlar, 72, 422
karbohidratlar, 42-44, 74-75
karbon dioksit, 8
karbon monoksit, 545-546, 561
kardiyolipin, 408
karotenoidler, 420-421
karsinojenler, 195, 634-635
karsinomlar, 632
karyoferinler, 329-332
kas distrofileri, 340-341, 443
kasılabilen halkalar, 452, 614
kasılan demetler, 441
kaslar, kasılma, 447-451
kaspazlar, 580-582, 582
katabolik yolaklar, 74
katabolit aktivatör protein (CAP), 253
katalazlar, 427
β-katenin, 530, 578, 663
katlanma
enzimler ve, 303
ER ve, 366-369
glikoproteinler, 370
polipeptid zincirleri, 52-54
protein, 298-309, 303, 366-369
RNaz'lar, 55
Kaufman, Matthew, 622
kaveola, 492, 515
kaveolin, 492
kayan filaman modeli, 449
kayan-kıskaç proteinler, 186

kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS), 105, 644
KDEL dizileri, 374, 386
kemiozmotik eşlenme, 410-414, 416-417
kemoterapi, 463, 572-573, 667
kemotripsin, 58, 60
kendi-kesip-ekleyen, 269, 271-272
Kendrew, John, 54
keratinler, 455-458, 460-461, 610
kesim bölgesi haritaları, 106-107
kesip-çıkarma onarımı, 197-201
kesip-ekleme, 266-272, 339
kıkırdak, 526
kırma indeksi, 22
kırmızı kan hücreleri. bkz. eritrositler
kıskaç yükleyen proteinler, 185-186
kilobaz (kb), 143
kinetokor mikrotübülleri, 466, 474, 612
kinetokorlar, 155, 610, 612, 617
kinezin, 455, 468, 470-471
kinonlar, 423
kirpik, 465, 474-478
Kirschner, Marc, 463, 466
kistik fibroz transmembran iletim düzenleyici (CFTR) gen, 507, 509
kistik fibroz, 507, 509
kitin, 519
kiyazma, 617
KKXX dizileri, 374, 386
klatrin, 387, 513
klatrin-kaplı çukurlar, 511, 514
klatrin-kaplı veziküller, 386-387, 511
klodinler, 532
klonlama, 107-108, 110, 124, 626
klor kanalları, 505-506
kloramfenikol, 292
klorofil, 73, 422
kloroplastlar
gelişmesi, 422
genomu, 417-418
işlevi, 415-417
mitokondriler ve, 12, 416-417
tanımı, 9
yapısı, 415-417
yerleşimi, 11
Knudson, Alfred, 657
koaktivatörler, 254
kodonlar, 100, 284
koenzim Q, 409, 411
koenzimler, 59-61, 67-68, 409, 411
kohezinler, 614
Kohne, David, 145
koilin, 339
koku reseptörleri, 561
kolaylaştırılmış difüzyon, 494-496, 508
kolçisin, 463
kolesterol
biyosentezi, 512
hücreye alınması, 511, 513
lipid sallar ve, 372
yapısı, 47, 373
zar akışkanlığı ve, 81
zarlarda, 485
kolin, 46
kollajen lifler, 524
kollajenler, 523-525
kollenkim hücreler, 13, 14
kolon kanseri, 201, 203, 635, 663
kolsemid, 463
kondensinler, 611-612
kondroitin sülfat, 526
konfokal mikroskopi, 24-25
konneksinler, 532
kontakt inhibisyon, 637-638
kontaktin, 455
kontrol elemanlar, cis-etkili, 238
kontrol noktaları, hücre döngüsü, 596-598
korepresörler, 256, 544-545
Kornberg, Arthur, 180
Kornberg, Roger, 151
kortikosteroidler, 543
kortizol, 543
kozmidler, 111
kök hücreler, 31, 127, 621-625
Krebs döngüsü. bkz. sitrik asit döngüsü,
Krebs, Ed, 312, 559
krista, 400
kromatidler, 617
kromatin,
bileşimi, 150
ilmik bölgeler, 338
lifler, 152
mikrograflar, 610
organizasyonu, 151, 326, 335-337
transkripsiyon ve, 256-259
yerleşimi, 324
yoğunlaşması, 152-153
kromatozomlar, 152
kromoplastlar, 420-421
kromozom yapısal koruyucu (SMC) proteinleri, 349, 613
kromozomlar
dağınık, 257
DNA ve, 93
genler ve, 90
insan kromozomu 1, 169, 172
kromatin ve, 150-154
mayoz, 90, 91, 615-620
metafaz, 154
mitoz, 153, 346, 474, 609-611
organizasyon, 335-337
ökaryot hücreler, 150
translokasyon, 651
uçlarının replikasyonu, 192-193
yoğunlaşması, 348-349
kronik miyeloid lösemi (KML), 667
Krüppel proteini, 255-256
küçük çekirdek RNA'sı (snRNA), 267-272, 343-344
küçük, nükleer ribonükleoprotein partikülleri (snRNP'ler), 269-272, 271, 334-335, 344

lac operonu, 238-239, 289
laktik asit, 7
laktoz metabolizması, 236-237
lamellipodlar, 446, 454, 574
lamininler, 526
laminler
interfazda yeniden oluşum, 349-350
MPF ve, 611
nükleer lamina ayrışması ve, 347-348
nükleer, 456
yapılanma, 326
Lander, Eric, 170-171
Lasek, Ray, 469, 470-471
Laskey, Ron, 299
Leber kalıtsal optik Nöropatisi (LHON), 403, 406-407
lenfomalar, 105, 632, 643, 656
lenfositler, 14, 15, 623, 624
leptoten evresi, 616
Lerner, Michael R., 268-269
Let-23 proteini, 577
let-60 geni, 577
LEU2 geni, 124, 191
Levi-Montalcini, Rita, 547
Lewis, Ed, 253
ligand-kapılı kanallar, 497
ligandlar, 511, 544
lignin, 521
lin-3 genleri, 577
lin-45 geni, 577
LINE'ler (serpiştirilmiş uzun elemanlar), 146-147, 221-225
lipid çift tabakalar. bkz. fosfolipid çift tabakalar,
lipid sallar, 372, 486, 492
lipidler
biyosentez, 75-76, 427
enerji deposu, 71-72
genel bakış, 44-47
Golgi metabolizması, 379-380
plazma zarlarında, 484-485
proteinlere bağlanma, 307-309
rolleri, 44
sentezi, 369-372
lipoproteinler, 511
lipozomlar, 125-126
lizat, 28
lizin (Lys) (K), 51
lizojeni, 212
lizozomal depo hastalıkları, 389-390, 392

lizozomlar
işlev, 389-394
mikroskop fotoğrafları, 390
oluşum, 390-391, 393
organizasyon, 390
protein hedeflenmesi, 386
proteoliz, 315-316
proton taşınması, 390
yerleşim, 10
zar proteinleri, 381-382
LMNA geni, 340-341
LMP1, 643
Lou Gehrig hastalığı, 461
lökoplastlar, 421
lökositler, 493, 529
lökotrienler, 548-549
lösemiler, 632-633, 639, 667
lösin (Leu) (L), 51
lösin fermuarı proteinleri, 253, 254

M çizgileri, 448, 449
M evresi, 592, 608-614
MacLeod, Colin, 93
Mad/Bub proteinleri, 613
magnezyum iyonu, 529
makrofajlar
fagositoz, 510
işlev, 15
kök hücreler ve, 622-623
mannoz-bağlayan reseptörler, 392
mikroskop fotoğrafları, 28
makromoleküller, 4-5, 42
makropinositoz, 515
malin tümörler, 632
Maller, James, 602
mannoz-6-fosfat, 377, 378, 381, 393
mantar, hücre duvarları, 520
MAP (mitojenle-aktive edilen protein) kinazlar, 565
Markert, Clement L., 599, 600-601, 619
Martin, Gail R., 622-623
Martin, Steven, 645
Masui, Yoshio, 599, 600-601, 619
matriks, mitokondri, 400
matriks-işlemci peptidazı (MPP), 404
Matthaei, Heinrich, 100
maya yapay kromozomları (YAC'lar), 111, 163
mayalar. bkz. *Saccharomyces cerevisiae*; *Schitzosaccharomyces pombe*
anlamsızlık-nedenli mRNA yıkımı, 275
deneysel model olarak, 16-17
DNA onarımı, 198-199
DNA polimerazlar, 181
genetik analizi, 124-125
genomu, 149, 161-162
Golgi aygıtı, 382
kompleksliği, 12
kromozom III, 162
RNA polimeraz II, 240
sentromerleri, 156
sıcaklığa-duyarlı mutantlar, 124
transkripsiyonel koaktivatörler, 258
mayoz
döllenme ve, 615-621
giriş, 599
mitoz ve, 616
oosit ve, 618-620
süreci, 615-618
tanım, 90
McCarty, Maclyn, 93
McClintock, Barbara, 211, 216
McKnight, Steven, 251
MCM proteinleri, 598-599
MDR taşıyıcı, 506
megabaz (Mb), 156
MEK (MAP kinaz /ERK kinaz) kinaz, 566-570
meme kanseri, 203, 226, 660
memeliler
hücre çekirdeği, 337
hücreler tarafından kolesterol alımı, 511, 513
MAP kinaz yolağı, 565-570
Mendel, Gregor, 90
mesajcı RNA (mRNA)
3' uçları, 265
görevleri, 48, 98-99
hekson, 142-142
işlenmesi, 264-266
kloroplast tarafından kodlanan, 417-418
monosistronik, 290
taşınması, 334-335
yapılanması, 141
yıkımı, 274-276
Meselson, Matthew, 96, 98
metabolik enerji
fotosentez ve, 422-426
genel bakış, 63-74
mitokondri ve, 399-408
metabolizma, evrim, 7-8
metafaz iği, 613
metafaz
hayvan hücreleri, 609
kromozomları, 153-154, 617
mikroskop fotoğrafları, 610
MPF ve, 611-613
sentrozomlar, 467
sırasında nükleus, 346
metal gölgeleme, 27
metastaz, 632
Methanococcus jannaschii, 160
methotrexate, 226
metillenme
DNA, 196, 260-261
histon, 258-259, 260
7-metilguanozin başlık, 265
metiyonin (Met) (M), 50, 51
Michel, Harmut, 423
mikrodikenler. bkz. filopodlar
mikrofilamanlar. bkz. aktin filamanları,
mikrotübül-bağlayıcı proteinler (MAP), 467, 470
mikrotübül-düzenleyici merkezler, 467-468
mikrotübüller
dinamik kararsızlık, 462
hücre içi organizasyonu, 464
hücre polaritesi ve, 467-468
kinetokora bağlanma, 612
mayoz ve, 617
mikroskop fotoğrafları, 610
mitoz sırasında, 155, 466-467
motor proteinler, 468-472
sinir hücresi, 468
yapılanması, 462
yapısı, 462
mikroviluslar, 445, 446, 491
mikrozomlar, 357, 359
Miller, Stanley, 5
Milstein, Cesar, 360
mineralokortikoidler, 543
miristik asit, 490
Mitchel, Peter, 411, 412-413
Mitchison, Tim, 463, 466
mitokondriler
genetik sistemi, 401-403
iç zarları, 80, 414
işlevleri, 399-408
kloroplastlar ve, 416-417
metabolitlerin taşınması, 414
mikroskop fotoğrafı, 390
tanımı, 9
translasyon, 403-408
yapısı, 400
yerleşimi, 10-11
mitoz iği, 155, 466, 610
mitoz
açık, 345, 346
evreleri, 609-611
kapalı, 345, 346
kromatin yoğunlaşması, 153-154
mayoz ve, 616
mikroskop fotoğrafları, 610
sırasında kromozomlar, 153, 474
sırasında mikrotübüller, 463, 466-467
sırasında nükleus, 345-350
tanımı, 592
miyelom, 360
miyofibriller, kasılma, 447
miyoglobinler, 54, 59
miyozin hafif-zincir kinaz (MLCK), 452
miyozin I ailesi, 446, 453

miyozin II, 449, 452, 614
miyozin V, 453-455
miyozinler
  etki tarzı, 450
  hücre hareketi ve, 447
  kalın filamanlar, 450
  kas dışı hücreler, 451-452
Mizutani, Satoshi, 103
MKK7, 570
moleküler biyoloji
  ana dogma, 98
  temel ilkeleri, 89-136
moleküler klonlama, 107-108
moleküler motorlar, 155, 447
Monod, Jacques, 236
monoklonal antikorlar, 120
monosakkaridler, 42-43
monosistronik mRNA'lar, 290
monositler, 14, 15
Montagnier, Luc, 105
Moore, Claire, 142-143
Moore, Peter, 287
morötesi ışını, 194-195, 634
MPF (olgunlaşmaya ilerleten faktör)
  Cdc2 ve, 602-605
  hedefleri, 611
  hücre döngüsünün ilerlemesi ve, 599-603
  inaktivasyonu, 613-614
  keşfi, 600-601
  mayoz ve, 619
  metafaz ve, 611-613
MreB, 436
Mullis, Kary, 115
multi-foton eksitasyon mikroskopisi, 25
Mut proteinleri, 200
mutagenez, 128-129
mutajenler, 180
mutasyonlar. bkz. spesifik mutasyonlar
  DNA dizileri ve, 97
  genlerde oluşturulması, 128-133
  kanser ve, 201
  tanım, 91
MutL geni, 201, 203
MutS geni, 201
Myc proteinleri, 654
Mycoplasma sp., 12, 160

Na^+-K^+ ATPaz. bkz. Na^+-K^+ pompaları
Na^+-K^+ pompaları, 503-508
NADH dehidrogenaz, 406-407
NADH, 401, 409
NADP redüktaz, 425
NADPH sentezi, 424
NAG'lar (N-asetilglukozaminler), 377, 383, 519
NAM (N-asetilmuramik asit), 519
N-asetilglukozaminler (NAG), 377, 383, 519
N-asetilmuramik asit (NAM), 519
nebulin, 448
Neher, Erwin, 497
neksin, 477
Nernst eşitliği, 498
nestin, 455
Neurospora crassa, 92, 93
Nicolson, Garth, 81, 486
nidojenler, 527
Niedergerke, Ralph, 449
nikel karbonil, 634, 635
nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+), 61, 67
nikotinik asetilkolin reseptörü, 500
Nirenberg, Marshall, 100
nişasta, 43
nitrik oksit (NO), 545-546, 546, 561
nitrik oksit sentaz, 545-546
nitrogliserin, 546
nitrozillenme, 312, 545
N-miristoillenme, 307-308
N-myc geni, 652
Noller, Harry F., 287, 288-289
Nomura, Masayasu, 285
norepinefrin, 546
Northern blot, 117
Notch sinyal iletimi, 579, 654
nöroblastom, 652
nörofilaman (NF) proteinleri, 456, 461
nörofilamanlar, 459
nörohormonlar, 547
nöronlar. bkz. aksonlar
  aksiyon potansiyelleri, 499
  fotoreseptör, 576
  işlevi, 15
  mikrotübüller, 468
  nörotransmiter salınımı, 500
  optik sinirler, 406-407
nöropeptidler, 547
nörotransmiterler, 500, 517, 546
nötrofiller, 511
NSF / SNAP kompleksi, 389
Nurse, Paul, 600
nükleasyon, aktin, 436
nükleer benekler, 338
nükleer çıkış sinyali, 331, 333
nükleer faktör-k B, 333
nükleer gözenek kompleksi, 324, 326-328, 332
nükleer lamina, 324-326, 340-341, 347-348, 350
nükleer reseptör süper ailesi, 544
nükleer zarf
  iki yönlü trafik, 323-325
  yapısı, 324-326
  yeniden oluşması, 350
  yıkımı, 345-348, 613
nükleer zarlar, 324, 348, 350
nükleik asit bazları, 49, 94-95
nükleik asitler
  bileşenler, 48
  biyosentezi, 79
  genel bakış, 47-50
  hibridizasyon, 117-119
  saptanması, 117-119
nükleoplazmin, 299, 328-329
nükleotid kesip-çıkarma onarımı, 197, 199
nükleotidler
  bileşimi, 48
  polimerleşme, 6, 49
  yapılar, 48
  yıkımı,
nükleozidler, 49
nükleozom kor partikülleri, 152
nükleozom yeniden biçimlendirme faktörleri, 259
nükleozomlar, 151-152
nükleusta yerleşme sinyalleri, 328

O^6-Metilguanin, 196
odak testi, 640
Okazaki fragmanları, 182-187
okludinler, 532
oksidatif fosforilasyon, 69, 408-414
oksidatif metabolizma, 8
oksijen, fotosentez ve, 8
oksinler, 521, 549
olgunlaşmayı ilerleten faktör. bkz. MPF,
oligonükleotidler, 49, 129
oligosakkarid transferaz, 367
oligosakkaridler
  hücre-hücre etkileşimleri ve, 44
  N-bağlı, 377, 378
  O-bağlı, 307, 379
  selektin bağlantısı, 493
  tanım, 42
omurgalılar, 19, 119
onkogenler
  abl, 652
  bcr, 652
  c-myc, 651-652
  *erb*B-2, 226
  insan tümörleri, 640
  kanser ve, 644-657, 649-653
  ras, 572-573
  retroviral, 645-646
  tanım, 35
  tümör gelişimi, 663
  ürünleri, 653-657
oositler
  amfibi, 225-226
  döllenmede, 621-622
  hücre döngüsü işleyişi, 599, 600-601
  mayoz ve, 615-621, 618-620
  mitokondri DNA'sı, 402

operatörler, 237
operon, 237
optik sinirler, 406-407
organik moleküller, 5
orijin replikasyon kompleksi (ORC), 190-191, 599
orta lamel, 533
orta-erken genler, 569
ortam
E. coli, 96
HeLa hücreleri, 32
hücre kültürü, 19
Neurospora, 93
otofagozomlar, 394
otofaji, 315-316, 393-394, 394
otofosforilasyon, 555-573
otokrin çoğalma uyarımı, 637
otokrin sinyal iletimi, 543
otoradyografi, 112
over kanseri, 649, 650
Oxa1, 407

öbakteriler, 8
ökaryotlar
DNA polimerazlar, 180-182
gen fonksiyonları, 123-133
genel transkripsiyon faktörleri, 240-243
genomları, 149-150
genomun kompleksliği, 139-150
hücre döngüsü, 591-598
kamçı, 475
kirpikler, 475
kromatin bileşimi, 150
kromozom sayıları, 150
mitoz sırasında nükleus 345, 347
mRNA'lar, 289
özellikleri, 4
promotörler, 246
proteine çevrim faktörleri, 291-296
replikasyon orijinleri, 190
represörler, 254-256
ribozom yapısı, 283, 285
RNA polimerazlar, 239-240
şaperon proteinler, 301
transkripsiyon, 244-261
translasyon başlangıcı, 294
yanlış eşleşme onarımı, 201
yapı, 9-12
ökosanoidler, 548-549
ökromatin, 153, 335-337
öncü diziler, 403
öncü iplikler, 182-183
östradiol, 47, 543
östrojen reseptörü, 544
östrojenler, 542, 543, 544, 635
özgünlük proteini1 (Sp1), 249, 250-252

P1 yapay kromozomları (PAC'lar), 111
p15 proteini, 607
p16 geni, 661-662
p21 proteini, 608, 622
p38 MAP kinaz, 569, 570
p53 geni, 659-660
p53 proteini, 597, 606, 642, 662-663, 669
pakiten evresi, 615
Palade, George, 25, 356
palmitik asit, 490
palmitoillenme, 309
papillomaviruslar, 642
parakrin sinyal iletimi, 542
Paramecium, 475-476
parankim hücreleri, 13, 14
parazitler, 401
pasif difüzyon, 494
pasif transport, 84
Patched protein, 578, 661
Pauling, Linus, 54, 94
PDK1, 565-566, 583
pektinler, 380, 520, 521
Pelger-Huët anomalisi, 340
penisilin, 519
pentoz şekerler, 43, 519
peptid bağları, 51-52, 52, 78
peptid hormonlar, 547-548
peptidil prolil izomerazlar, 303
peptidil transferaz reaksiyonu, 287
peptidoglikanlar, 518-519
periferal zar proteinleri, 81, 486
perlekan, 526
peroksizom hedefleme sinyalleri (PTS), 430
peroksizomlar
genel bakış, 426-427
işlevleri, 427-429
mikroskop fotoğrafı, 426
yapılanması, 429-430
yerleşimi, 10-11
Philadelphia kromozomu, 652
piebaldizm, 20
pigmentler, 20. bkz. klorofil.
pinositoz, 510
PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat), 562-563, 565, 583, 621
pirimer kültür, 33
pirimidin dimerleri, 195-196, 196
pirimidinler, 48
pirinç genomu, 166-167
piruvat, 69, 401
PKN kinaz, 575
plakinler, 458
plastidler, 415, 420-421
plastokinon (PQ), 424
plastosiyanin (PC), 424, 425
platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, 553, 653, 654
platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), 548, 555
plateletler, 529, 548, 549, 623
plazma zarları
apikal bölgeler, 381
bazolateral bölgeler, 381
bileşim, 80
dondurup-çatlatma, 27-28
elektroporasyon, 126
eritrosit kortikal hücre iskeleti, 443
fokal adezyonlar, 444
glikokaliks, 493
iyon gradientleri, 505
kalsiyum iyonları ve,
kaveola, 515
sıkı bağlantılar, 531
tanım, 9
yapı, 483-493
plazmalojenler, 427
plazmidler, 109-110
plazmodesma, 533
plektinler, 458-459
pluripotent kök hücreler, 624
PML/RARa, 655-656, 666
Pneumococcus, 93-94
polar cisimler, 620
polar mikrotübüller, 467, 613
poli-A kuyruklar, 265-266
poliadenilasyon, 265
polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 115, 117, 119
polimerleşme
aktin, 436
moleküllerin, 5
nükleotidlerin, 6, 49
polinükleotidler, 49, 80
poliovirus, 101
polipeptidler, 51, 54
polipler, 634
polisakkaridler
biyosentezi, 76
glukoz depo, 75
Golgi metabolizması, 379-380
hücre-hücre etkileşimleri ve, 44
tanımı, 42
yapılar, 44
yıkımı, 71
polisistronik mRNA'lar, 289-290
politen kromozomlar, 164, 336
polizomlar, 297
Pollard, Tom, 438
polyomaviruslar, 641
porinler, 401, 489, 496
Porter, Keith, 25
potasyum iyonları, 497
potasyum kanalları, 501, 503
pre-mRNA, 264-266, 266-267, 269-272
prenillenme, 308
pre-rRNA, 262, 343-344

pre-tRNA, 263-264
primazlar, 183
primerler, floresan, 113
problar, 117, 119-121
profaz, 346, 467, 609, 610, 616
profilin, 439
progesteron, 543, 599, 600-601
programlanmış hücre ölümü, 579-584, 639, 656 ayrıca bkz. apoptoz
prokaryotlar
  DNA replikasyonu, 184
  genomlar, 159-161
  günümüz, 8-9
  hücre özellikleri, 4
  mRNA'lar, 289
  ribozom yapısı, 283, 285
  şaperon proteinler, 301
  transkripsiyon, 232-239
  translasyon faktörleri, 291
prokollajen, 524
prolaktin, 547
prolin (Pro) (P), 51
prometafaz, 346, 610-611
promotörler, 232, 246
pronükleus, 621
proplastidler, 421-422
prostaglandinler, 548-549
prostasiklin, 548-549
prostetik gruplar, 59
proteazlar, 638
proteazomlar, 314
protein 4.1, 443
protein disülfid izomerazlar, 303, 367
protein fosfatazlar, 311, 312, 561
protein katlanması, bkz. katlanma
protein kinazlar, 311, 559-560, 561, 563, 635
proteine çevrilmeyen 3' ucu, 290
proteine çevrilmeyen 5' bölge, 289
proteine çevrilmeyen bölgeler, 289-290
proteine çevrim
  bakterilerde, 293
  başlama sinyalleri, 290
  düzenlenmesi, 296-298
  in vitro, 358-359
  mitokondride, 403-408
  mRNA, 281-298
  protein sentezi ve, 78
  sonlanması, 296
  süreci, 290-296
  tanımı, 98
  uzama evresi, 295
proteinler
  antibiyotikler ve sentez, 292
  biyosentez, 76-78
  çapalayan, 490
  denatürasyon, 52-54
  domeyn (bölgeler), 55
  dördüncül yapı, 56
  endozomlarda ayrım, 516
  ER ve salgılanma, 356-357
  fosforillenme, 63, 559
  genel bakış, 50-56
  genlerle benzerlikleri, 97-98
  glikozillenme, 368, 377-379
  ikincil yapılar, 55
  işlenme, 298-309
  işlev düzenlenmesi, 309-313
  katlanma, 298-309
  kesilmesi, 303-305
  kloroplast alımı, 418-420
  kloroplast dağıtımı, 418-420
  lipid bağlantısı, 307-309
  mitokondriye giriş, 403-408
  nükleusa giriş, 332-334
  paketlenme, 373
  salgı, 358-359, 361
  saptanması, 119-123
  sentezi, 283
  sınıflandırma, 380-382, 407
  taşınması, 328-332
  translasyon sonrası yer değiştirme, 362
  üçüncül yapılar, 55
  yapısı, 54-55
  yıkımı, 313-317, 516, 517
protein-protein etkileşimleri, 313
protein-serin / treonin kinazlar, 312, 558, 565, 566
protein-tirozin fosfatazlar, 557-558
protein-tirozin kinazlar, 312
proteoglikanlar, 526
proteoliz, 303-305, 315-316
proton gradienti, 410, 411-414
proton pompası, 507, 515-516
protonlar, 404, 506-507
protoonkogenler, 646-648, 648-649
proviruslar, 102-103
psödogenler, 148-149, 149
PTB (fosfotirozin-bağlanma bölgeleri), 556
PTEN geni, 660
PUMA, 662
puromisin, 292
pürinler, 48
pürinsizleşme, 194

R7 farklılaşması, 576
Rab ailesi proteinleri, 385, 387, 388-389, 568
Rabl,C., 335
Rac, 574-575
RAD genleri, 198-199
Rad23 proteini, 199
RAD51, 211
radyasyon, 195, 634
raf geni, 645
Raf kinaz, 566-570, 568-569
Raf proteini, 653
Raf protoonkogeni, 647
RAG1 proteini, 216
RAG2 proteini, 216
Ran proteinleri, 329-332, 332, 333, 568
ras onkogen ailesi, 572-573, 645, 649-650
Ras proteinleri, 490, 566-570, 650, 653, 668
Ras/Raf/ERK yolakları, 605-606
Rayment, Ivan, 450
Rb geni, 657-660, 661
Rb proteini, 606
RecA, 210-211
Reclinomonas americana, 402
Reese, Thomas S., 469, 470-471
regülatör diziler, cis-etkili, 245-249
regülatör hafif zincirler, 452
rekombinant DNA, 104-117, 121-123
rekombinasyon sinyalleri (RS), 216-217
rekombinasyonel onarım, 202-203
replikasyon çatalları, 182-187
replikasyon faktörü C (RFC), 185-186
replikasyon orijini (ori), 110-111, 189
represörler, ökaryot, 254-256
reprodüktif klonlama, 625
reseptör down regülasyonu, 517
reseptör olmayan protein-tirozin kinazlar, 557, 571-572
reseptör protein-tirozin kinazlar, 553-556, 563, 576-577
reseptörler, 541-550, 561
restriksiyon endonükleazlar, 104-107
restriksiyon noktası, 595
ret onkogeni, 664
retinoblastomlar, 657-660
retinoid sentezi, 544
retinoik asit reseptörleri, 655, 666
retinoik asit, 543, 544, 655-656, 668
retrotranspozonlar, 147, 220, 222, 225
retroviral vektörler, 126
retrovirus-benzeri elemanlar, 147
retroviruslar
  DNA organizasyonu, 220
  HIV, 105
  onkogenler, 644, 645-646
  replikasyon, 103, 220
  RNA genomlar, 36
revers transkriptaz, 102-103, 192-193, 220, 222
Rho ailesi proteinleri, 454, 574-575
Rhodospeudomonas viridis, 423, 489
ribonükleazlar (RNaz'lar), 52-54
ribonükleik asitler (RNA'lar), 48
ribonükleoprotein (RNP), 268, 334
riboz, 43, 48
ribozimler, 263
ribozomal RNA (rRNA)
  16S, 286
  gen yapısı, 340

geni, 243
işlenme, 262, 343-344
işlev, 99
katalitik rolü, 288-289
kloroplast kodu, 417-418
nükleolar organizasyon ve, 339-342
rolleri, 48
taşınma, 334-335
transkripsiyon, 342-343
ribozomlar
mRNA çevriminde, 283-289
RNA geni, 243
tanımı, 8
yapılanma, 344-345
yapısı, 285
yerleşim, 10-11, 324
ribuloz 1,5-bisfosfat, 428, 429
ribuloz bisfosfat karboksilaz (rubisko), 418, 428
Richardson, William D., 330
Rickettsia prowazekii, 401
rII geni, 99-100
riyanodin reseptörleri, 564
RNA dünyası, 6
RNA interferens (RNAi), 130-131
RNA polimerazlar
E.coli, 232
I, 243-244
II, 241-242, 604
III, 243-244, 339
ile transkripsiyon, 234, 243-244
işlev, 99
kloroplast, 417-418
ökaryot, 239-240
transkripsiyon-eşlikli onarım, 200
yapı, 235
RNA tümör virusları. bkz. retroviruslar
RNA virusları, 100-103
RNA'lar. bkz. mesajcı RNA; ribozomal RNA; taşıyıcı RNA'lar
ara ürünler, 220-225
düzeltme, 273-274
işlenme, 262-266
kendini kopyalama, 6
kesip-ekleme, 141
kloroplast kodu, 417-418
kodlamayan, 259-260
primerler, 183-184
sentez, 98, 232
telomeraz, 192-193
yıkım, 274-276
RNA-DNA hibridleri, 141-143
RNaz H, 184, 221
RNaz P, 263, 288
Roberts, Bruce L., 330
Roberts, Richard, 141, 142
Rodbell, Martin, 551
rodopsin, 561-562
Roeder, Robert, 240
Rothman, James, 383, 387
Rous sarkom virusu (RSV), 35, 102-103, 553-555, 640, 644, 648-649
Rous, Peyton, 35, 644
Rsk, 584, 620
Rubin, Harry, 640
rubisko (ribuloz bisfosfat karboksilaz), 418, 428
Ruderman, Joan, 602
Ruv proteinleri, 211

S evresi, 592, 593
Sabatini, David, 358
Saccharomyces cerevisiae
büyüklüğü, 12
cdc28 mutantları, 600, 602
deneysel model olarak, 16-17
DNA replikasyonu, 190-191
genetik analizi, 123-124
genomu, 161-162
haploid DNA, 12
hücre döngüsü düzenlenmesi, 594-595, 599
intronları, 149
MAP kinaz yolağı, 569
mayoz, 615
mikroskop fotoğrafı, 12, 16
sentromerler, 156
sağaltıcı klonlama, 625
Sakmann, Bert, 497
salgı vezikülleri, 356
salgı yolakları, 356, 364, 381, 385-387
Sanger yöntemi, 112
Sar1, 385
sarkomerler, 447, 448
sarkomlar, 632
sarmal cisimler. bkz. Cajal cisimler
sarmal-dönüş-sarmal bölgeler, 253
sarmal-ilmik-sarmal bölgeler, 253, 254
sarmal-ilmik-sarmal proteinler, 253-254
scaffold (yapı iskelesi) proteinleri, 570
Scc1, 614
Schatz, Gottfried, 403
Schekman, Randy, 383
Schitzosaccharomyces pombe
cdc2 mutantları, 600
genomu, 161-162
hücre döngüsü, 595, 596
kodlamayan RNA'ları, 260
replikasyon orijinleri, 190-191
sentromerler, 155-156, 157
Schleiden, Matthias, 21
Schwann, Theodor, 21
SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), 120
sec geni mutantları, 383
Sec61, 383
Sec62/63 kompleksi, 362
seçicilik faktörü 1 (SF1), 244
Sefton, Bartholomew M., 553, 554-555
sekürin, 615
Sela, Michael, 52-53
selektinler, 493, 528, 529
selim tümörler, 632
sellüloz sentaz, 521-522
sellülozlar, 43, 379, 519-520, 521, 522
sentriol çevre materyali, 464-465
sentrioller, 464-466
sentromerler, 154-157, 156, 611
sentrozomlar, 463-464, 465, 611
separaz, 615
seramid, 372, 373
serbest enerji, 64-66
serin (Ser) (S), 46, 51, 429
serin proteazlar, 59
serotonin, 546
sert keratin, 456
serum yanıt elemanları (SRE), 569
serum yanıt faktörleri (SRF), 569
servikal karsinom, 635
sevenless mutantları, 576
sfingomiyelin, 45, 46, 372, 379, 484
SH2 (Src homoloji 2) bölgeleri, 556, 571-572
Sharp, Phillips A., 141, 142-143, 251
Sheetz, Michael P., 450, 469, 470-471
Shine-Delgarno (SD) dizileri, 114, 290
sıcaklığa-duyarlı mutantlar, 124
sıkı bağlantılar, 492, 531
sınıflandırma (ayırma)
endozomal, 516
protein, 358, 407
sıvı fazlı endositoz, 515
siklik AMP (cAMP) yolakları, 559
siklik GMP (cGMP), 561-562
siklin ailesi, 603-605
siklin B, 314-315, 602-603, 613
siklin-bağımlı kinazlar (Cdk'lar), 604-605
siklinler, 600-604, 603, 606-607
sikloheksimid, 292
siklooksijenaz, 548-549
simian virus 40. bkz. SV40
simport, 508
sinaps, 617
sinapslar, 500
sinaptik veziküller, 385, 517
sinaptonemal kompleks, 617
sindekanlar, 526
SINE (serpiştirilmiş kısa elemanlar), 146-147, 223, 224-225
Singer, Jonathan, 81, 486
sinir büyüme faktörü (NGF) reseptörü, 553
sinir büyüme faktörü (NGF), 547, 555, 576-577
sinir hücreleri. bkz. nöronlar,

sinir hücresi adezyon molekülleri (N-CAMS), 530
sinyal diziler, 304, 357, 359, 366
sinyal hipotezi, 360-361
sinyal iletimi, hücresel, 541-589
sinyal iletimi
  hücre içi, 558-571
  hücre iskeleti ve, 571-572
  kanser ve, 572-573
  onkogenler ve, 653-657
sinyal peptidazlar, 304, 361
sinyal tanıyan partiküller (SRP), 359, 420
sinyal yamaları, 379
sistein (Cys) (C), 51
sistemik lupus eritematoz, 268
sitokalasinler, 438, 454
sitokin reseptörü süperailesi, 557
sitokinez, 452, 592, 615-616, 618
sitokininler, 549
sitokinler, 548
sitokrom *b*, 406
sitokrom bc kompleksi, 423
sitokrom bf kompleksi, 418, 424
sitokrom c, 409, 581
sitokrom oksidaz, 409
sitokromlar, 489
sitoplazmik dinein, 470-471
sitostatik faktör (CSF), 619-620
sitozin (C), 48, 194
sitrik asit döngüsü, 67-70, 401
siyanobakteriler, 8
sklerenkim hücreleri, 14
Sm, tanımlanması, 268
Smac/ Diablo proteini, 582
SMAD'lar, 558
Smad2 geni, 660, 661, 663
Smad4 geni, 660, 661, 663
SMC (kromatin yapısal koruyucu) proteinleri, 349, 613
Smith, Alan E., 328, 330
Smith, Dennis, 599, 601
Smoothened proteini, 578, 660-661
SNARE hipotezi, 387
SNARE proteinleri, 515
sodyum iyonu, 497-508, 507
sodyum kanalları, 501, 503, 561
sonikasyon, 28
sonlandırma faktörleri, 296
sonlanma sinyalleri, 235
Sos, 568
Southern blot, 117, 118
spektrin, 442, 488
sperm, 621-622
splisozomlar, 267, 269-270, 272
Spo11, 618
Spudich, James, 450
Src ailesi kinazlar, 557
src geni, 554-555, 572, 645
Src proteinleri, 490
Src protein-tirozin kinaz, 554-555
SRP reseptörü, 359, 361
srpRNA, 359
Stahl, Frank, 96
START, 594-595, 600, 604
STAT (transkripsiyon sinyal iletici ve aktivatörleri) proteinleri, 570-571
Stehelin, Dominique, 648-649
Steitz, Joan A., 268-269
Steitz, Thomas, 287
steroid hormon reseptörleri, 253
steroid hormonlar, 47, 543-545
steroidsiz anti-yangısal ilaçlar, 549
sterosiller, 445
STI-571, 667
stratmin, 467
streptomisin, 292
stres lifleri, 444, 452, 574
stroma işlemci peptidazları (SPP'ler), 419
stroma, 415, 422
su kanal proteinleri, 496
Su(H), 579
su, özellikleri, 41-42
SUMO (küçük, ubikütin-ilişkili değiştirici), 314
Sutherland, Earl, 559
sübstratlar, enzimatik, 56, 58-59
SV40
  DNA replikasyonu, 181
  güçlendirici, 247
  promotörü, 249
  replikasyon orijinleri, 189
SV40 T antijeni, 330-331, 643
SW15, 333-334

şaperonin, 418-419, 418-420
şaperonlar, 299-303, 299, 403-404, 544. *ayrıca bkz.* özgül şaperonlar
şekerler, 48
şişe mantarı, 21

T antijenleri, 328, 330-331, 642, 659
T hücre reseptörleri, 214, 216
T lenfositler, 214, 216, 624
T4 lenfositler, 105
taksol, 463
talin, 444-445
Taq polimeraz, 115, 116
taşıma vezikülleri, 373, 385-387
taşıyıcı proteinler, 83-84, 495
taşıyıcı RNA'lar (tRNA'lar)
  görevleri, 48
  işlenmesi, 263-264
  işlevi, 99
  kloroplast kodu, 417-418
  mitokondri genomu, 402
  mRNA çevriminde, 282-283
  taşınması, 334-335
  yapısı, 282
  yıkımı, 221
TATA kutuları, 241, 244
TATAya-bağlanan proteinler (TBP), 241, 243-244
Tatum, Edward, 92
tau proteini, 468
tax geni, 644
TBP-bağlanan faktör (TAF), 241
TbRII geni, 660-661
Tcf/LEF ailesi, 578
tek iplik DNA'ya bağlanan proteinler, 186, 189
tekrarlamayan aralayıcı diziler, 149
Tel transkripsiyon faktörü, 654
telofaz, 346, 349-350, 609, 610, 613-614
telomerazlar, 191-192
telomerler, 157-158, 158, 191-192
Temin, Howard, 101-103, 640
teratokarsinomlar, 622-623
terminal ağ, 446
termoasidofiller, 8
ters genetik, 128
ters transkripsiyon, 102
testosteron, 47, 543
Tetrahymena
  28SrRNA, 269
  histon asetiltransferazı, 258
  kendi-kesip-ekleme, 269
  rRNA ribozim, 288-289
  telomerazı, 192
  telomerleri, 157, 158
tetrasiklin, 292
TFIIE, 241
TFIIH, 199, 241, 604
TFIIIA, 244
Thermus aquaticus, 115, 288
Ti plazmidi, 127-127
Tic kompleksleri, 418-419
tilakoid zarlar, 415, 416, 420, 422-423
Tim kompleksleri, 403-405, 407
timin (T), 48
tiroid hormon reseptörleri, 544, 545
tiroid hormonları, 544
tirotropin, 654
tirozin (Tyr) (Y), 51
titin, 448
Tjian, Robert, 249, 251
Toc kompleksleri, 418-419
Tom kompleksleri, 403-405, 407
tomurcuklanan mayalar. bkz. *Saccharomyces cerevisiae*
Tonegawa, Susumu, 218-219
topoizomerazlar, 186-187
Torpedo ray, 500
trake, 13
trans Golgi ağı, 375-377, 380-381, 386, 393, 513-514
transdusin, 561-562
trans-etkili faktörler, 238
transfeksiyon, 125-128

transferin reseptörü, 275
transformasyon, genetik, 93
transforme edici büyüme faktörü-b (TGF-b), 558, 607, 663
transformer geni, 273
transgenik fareler, 126-127
transisyonel endoplazmik retikulum, 356
transit peptidler, 418
transkripsiyon aktivatörleri, 252, 254
transkripsiyon faktörleri, 240, 250-252
transkripsiyon
  kodlamayan RNA'lar ve, 259-260
  kromatin yapısı ve, 256-259
  ökaryotlar, 244-261
  pozitif kontrolü, 238-239
  prokaryotlarda, 232-239
  sonlanması, 235-236
  tanımı, 98
transkripsiyon-eşlikli onarım, 200-201
translokazlar, 405
translokonlar, 359
transmembran proteinler, 81, 487
transmisyon elektron mikroskopisi, 26
transpozaz, 216, 219
transpozonlar, 220
transsitoz, 517-518
treonin (Thr) (T), 51, 62
treonin deaminaz, 62-63
triaçilgliseroller, 45, 72
trikotiyodistrofi, 199
trioz şekerler, 43
triptofan (Trp) (W), 51
tromboksanlar, 548-549
tropomisin ailesi proteinleri, 441, 451
troponinler, 451
t-SNAREler, 388-389
turgor basıncı, 521
tutunma (*att*) bölgeleri, 212, 213
tübülinler, 462-462
tümör baskılayıcı genler, 606, 657-660, 663
tümör nekroz faktörü (TNF), 558, 582
tümörler. bkz. kanser
  baskılayan genler, 606, 657-660, 663
  başlangıcı, 633-634
  deri, 636
  kamçılayıcılar, 635
  gelişimi, 663
  ilerlemesi, 634
  klonalite, 633
  onkogenleri, 646
  tanımı, 632
  viruslar, 640-644
tütün dumanı, 634
tütün mozaik virusu, 101
ubikünon. bkz. koenzim Q
ubikütin ligaz (E3), 314
ubikütin, 313-314
ubikütin-konjuge eden enzim (E2), 314
ultrasantirfüjleme, 28-29
Ulusal Sağlık Enstitüsü, 170
Uluslar arası İnsan Genomu Dizileme Konsorsyumu, 169
uniport, 508
urasil (U), 48, 100
Uvr genleri, 198
UvrABC eksinükleaz, 200
uydu DNA, 146, 157
uzama faktörleri, 259
uzama, translasyon, 295
uzun uç tekrarları (LTR'ler), 220, 222

üçüncül yapı, 55
üreme, 89, 91
üridin 5'-monofosfat (UMP), 48
üridin, 48
ürünler, enzimatik, 56

vakuoller, 9, 10-11, 382
Vale, Ronald D., 469, 470-471
valin (Val) (V), 51
van Leeuwenhoek, Antony, 21
Varmus, Harold, 647, 648-649
Vassar, Robert, 460-461
VDJ rekombinasyonu, 214-217
vektörler
  bakteriyofaj P1, 111
  bakulovirus, 114
  DNA klonlanması için, 111
  -e klonlama, 109
  kozmid, 111
Venter, J. Craig, 159, 169, 170-171
veziküler taşınma, 382-389
veziküller, 387-388, 472-473
video ile güçlendirilmiş diferansiyel interferans-kontrast mikroskopisi, 23
video ile güçlendirilmiş mikroskopi, 469
villin, 446
vimentin, 456
vinblastin, 463
vinkristin, 463
vinkülin, 444, 455
viral genomlar, 141
virionlar, 103
virulans (vir) genleri, 128
viruslar
  DNA geçişi, 93
  DNA provirus hipotezi, 102-103
  genomları, 106-107
  hayvan, 36-37
  kültürü, 34-37
  onkogenler, 648-649
  RNA, 100-103
  tümör kamçılama, 635
  tümör, 640-644
  yapı, 34
vitamin D_3, 543, 544
Vogelstein, Bert, 663
Vogt, Peter K., 645, 648-649
voltaj-kapılı kanallar, 497, 501, 502
Volvox, 13

Wallace, Douglas, 406
Walsh, Donal, 559
Watson, James, 94, 170, 180
Wee1 protein kinaz, 603, 604
Weinberg, Robert, 649
Western blot, 120
White, Frederick H., 52-53
Wilkins, Maurice, 94
Willm's tümörü, 660
Wnt yolağı, 578, 654
wobble, 283, 402
WT1 geni, 661

X kromozom inaktivasyonu, 260
X kromozomuna-bağlı hastalıklar, 340-341
Xenopus laevis, 19
Xenopus oositleri, 341
xeroderma pigmentoza (XP), 199
X-ışını kristallografisi, 54, 285
Xist, 260
XPB proteini, 241
XPD proteini, 241

yağ asitleri, 44-45, 72, 308, 427
yağlar. bkz. triaçilgliseroller
yalancı ayak, 13, 446, 454
yalıtıcılar, 248
yama-kıskacı yöntemi, 497
yangı, 15
yanlış düzeltme (proofreading), 188
yanlış eşleşme onarımı, 200
Yanofsky, Charles, 97
yarı korunumlu replikasyon, 96-97
yaygın büyük B-hücreli lenfoma, 665
yer değiştirebilen elemanlar, 216
yer değiştirme, 216, 221-225
yeşil floresan protein (GFP), 24
yetki faktörleri, 599
yıldızsı mikrotübüller, 467, 614
yoğunluğa-bağlı inhibisyon, 636
yoğunluk-gradient santirfügasyonu, 29, 96
yukarı bağlanma faktörleri (UBF'ler), 243, 244
yumuşak keratin, 456
yüksek-enerjili bağlar, 65
yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları, 61

Z diski, 448, 449
Zamecnik, Paul, 282
zara tutunmuş büyüme faktörleri, 548
zarlar. bkz. fosfolipid çift tabakalar
  ER, 362
  genel bakış, 80-85
  hücresel, 80-85
  mitokondri, 400-401, 414
  potansiyel, 498-499
  protein hareketi, 491
  protein sabitlenmesi, 82
  protein yer değiştirmesi, 304, 403-408
  protein yönlendirilmesi, 363, 420
  proton gradienti, 411-414
  Rab iletimi, 388
Zea mays (mısır), 12
zebra balığı, 12, 19-20, 20
Zellweger sendromu, 430
zigot, 620
zigoten evresi, 615
Zimniak, Ludwika, 288-289

Yazarlar Hakkında

GEOFFREY M.COOPER Boston Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde profesör ve bölüm başkanıdır. Lisans (B.S) derecesini 1969'da Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden (MIT), Biyokimya alanındaki doktora (Ph.D.) derecesini 1973'de Miami Üniversitesi'nden almıştır. Daha sonra doktora sonrası çalışmalarına Wiskonsin Üniversitesi'nde Howard Temin ile devam etmiş, burada Raus sarkoma virusu ve benzer diğer virusların proviral DNA'larını tanımlamak için gen transfer ölçümleri geliştirmiştir.

Dr. Cooper 1975'de, araştırma çalışmalarını insan tümörlerindeki onkogenlerin tanımlanması alanına genişlettiği, Dana-Farber Kanser Enstitüsü ve Harvard Tıp Fakültesi öğretim üyeleri arasına katılmıştır. 1998'de Boston Üniversitesi'ne geçtiğinde, hem araştırmalarını sürdürmüş, hem de üniversitenin yaşam bilimleri programlarının büyük ölçüde genişletilmesi çalışmalarına katılmıştır.

Dr.Cooper'ın sürmekte olan araştırmaları, onkogen proteinlerinin hücre proliferasyonu, farklılaş-ması ve programlanmış hücre ölümünü kontrol eden sinyal ileti yolaklarındaki rollerinin anlaşılmasına odaklanmıştır. *Science, Nature* ve *Cell* gibi dergilerde 100 den fazla araştırma makalesi yayınlan-mıştır ve 1984'te "hücresel onkogenlerin bulunması ve tanımlanması" konusunda Birleşik Devletler Ulusal Bilimler Akademisi'nden "*U.S Steel Award*" almıştır. Dr. Cooper kanser hakkındaki topluma yönelik iki kitabın; İnsan Kanserlerinin Ögeleri ve Onkogenler (*Elements of Human Cancer and Oncogenes*) ile Kanser Kitabı (*The Cancer Book*); yazarıdır. Ayrıca DNA Provirus: Howard Temin'in Bilimsel Mirası (*The DNA Provirus: Howard Temin's Scientific Legacy*) başlıklı anma kitabının, Rayla Greenberg Temin ve Bill Sugden ile birlikte editörüdür.

ROBERT E. HAUSMAN Boston Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Profesör ve Lisansüstü Eğitim Direktörüdür. Doktora (Ph.D.) derecesini 1971'de Northwestern Üniversitesi'nden Biyolojik Bilimler alanında alırken, doktora sonrası çalışmalarını Chicago Üniversitesi'nde Aron Moscona ile sürdürmüş, burada erken embriyonik gelişim sırasında hücre-hücre etkileşimlerini araştırmış ve orijinal hücre adezyon moleküllerinden birini tanımlamıştır. 1978'de Boston Üniversitesi öğretim üyelerine katılmış, araştırmalarını kas gelişiminde hücre yüzey etkileşimleri ve sinir sisteminin gelişiminde gen ekspres-yonunun hücre-hücre etkileşimi ile düzenlenmesi alanına genişletmiştir. Dr. Hausman Boston Üniversite-sinde lisans düzeyinde hücre biyolojisi dersi ve lisansüstü düzeyde çok sayıda gelişim biyolojisi kursu vermiştir, Profesör Cooper ve Hausman halen hücre biyolojisini birlikte öğretmektedirler. Araştırmaları hücreler arasındaki ve hücreler ile hücre dışı matris arasındaki etkileşimlerin farklılaşma ve morfogenezi nasıl etkilediklerinin anlaşılmasına odaklanmıştır.

Kitap Hakkında

Editör: Andrew D. Sinauer
Proje Editörü: Chelsa D. Holabird
Ürün Müdürü: Christopher Small
Kitap Yapımı: Janice Holabird
Görüntüleme Programı: Dragonfly Media Group
Resim Araştırmaları: David McIntyre
Kitap Tasarımı: Jefferson Johnson
Kapak Tasarımı: Joan Gemme
Renk Seçici: Burt Russell Litho
Kapak ve Kitap Yapımevi: Courier Companies, Inc.

Türkçe Çeviri: Meral Sakızlı, Neşe Atabey
Türkçe Çeviri Basımevi: İzmir Tıp Kitabevi